

PCT/JP03/16603

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

30.01.04

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 2 月 2 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 7 3 2 9 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 7 3 2 9 7]

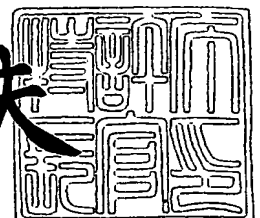
出 願 人 池田食研株式会社
Applicant(s):

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

2 0 0 4 年 3 月 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 1 6 4 0 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 IKDSK024

【提出日】 平成14年12月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 広島県福山市箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内

【氏名】 小村 啓悟

【発明者】

【住所又は居所】 広島県福山市箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内

【氏名】 眞田 浩一

【発明者】

【住所又は居所】 広島県福山市箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内

【氏名】 矢田 貴子

【発明者】

【住所又は居所】 広島県福山市箕沖町 9 5 番地 7 池田食研株式会社内

【氏名】 森田 哲成

【特許出願人】

【識別番号】 000210067

【住所又は居所】 広島県福山市箕沖町 9 5 番地 7

【氏名又は名称】 池田食研株式会社

【代表者】 桑田 和典

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 140100

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 補酵素結合型グルコース脱水素酵素

【特許請求の範囲】

【請求項1】

電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒し、マルトースへの作用性が低いことを特徴とする可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

【請求項2】

電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒し、マルトースへの作用性が5%以下であり、1,10-フェナントロリンで阻害されることを特徴とする可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

【請求項3】

終濃度50mMの1,10-フェナントロリンで50%以上阻害されることを特徴とする請求項1ないし2記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

【請求項4】

補酵素がフラビン化合物であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

【請求項5】

グルコースの1位の水酸基を酸化することを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

【請求項6】

微生物由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

【請求項7】

微生物が真核微生物であることを特徴とする請求項6項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

【請求項8】

寄託菌株FERM P-19103由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素であることを特徴とする請求項1～7のいずれか1項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

【請求項 9】

電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒し、マルトースへの作用性が低い補酵素結合型グルコース脱水素酵素の性質および／または実質的に同等な性質を有するタンパク質またはその塩について、該タンパク質をコードするアミノ酸配列あるいは当該配列に 1 またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、置換もしくは付加による変異を含むアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的に活性で安定なタンパク質であることを特徴とする補酵素結合型グルコース脱水素酵素。

【請求項 10】

電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒し、マルトースへの作用性が低い補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産能を有することを特徴とする微生物。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の微生物が真核微生物であることを特徴とする微生物。

【請求項 12】

請求項 10 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の微生物が寄託株 F E R M P - 1 9 1 0 3 である補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産能を有することを特徴とする微生物。

【請求項 13】

電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒し、マルトースへの作用性が低い補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生産する微生物を培養し、培養により補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生成せしめ、これを採取することを特徴とする補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 14】

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用することを特徴とする測定方法。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有することを特徴とする測定試薬。

【請求項 16】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用することを特徴とする測定試薬組成物。

【請求項 17】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用することを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 18】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有することを特徴とするグルコースの測定試薬組成物。

【請求項 19】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有することを特徴とするグルコースの消去試薬組成物。

【請求項 20】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有することを特徴とする有機化合物の製造試薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法、および該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産能を有する微生物に関する。

【0002】

また、本発明は試料中のグルコースの測定に際し、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した測定方法、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有する試薬および試薬組成物に関する。さらには有機化合物の製造方法などを含む製造原料などの物質生産および分析の用途に関する。

さらに、本発明は試料中の特定成分を迅速かつ簡便に高精度で定量することができるバイオセンサに関する。具体的には、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用したグルコースセンサに関する。

【0003】

【従来の技術】

グルコースは血液中に存在し、糖尿病の重要なマーカーとして利用されている。グルコース測定法としては、従来から化学法と酵素法が存在するが、一般的に特異性、安全性の面で酵素法が優れているとされている。酵素法としては、グルコースオキシダーゼ、グルコース 6 リン酸脱水素酵素あるいはNAD(P)依存性グルコース脱水素酵素を使用した測定法がある。しかし、グルコースオキシダーゼあるいはグルコース 6 リン酸脱水素酵素を使用した測定法は、複数の酵素を使用するため簡便な反応系ではない。一方、グルコース 6 リン酸脱水素酵素やNAD(P)依存性グルコース脱水素酵素を使用した測定法では反応系に補酵素であるNAD(P)を添加しなければならないという煩雑性があった。

【0004】

近年、試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく簡易に定量する方式として、様々なバイオセンサが提案されている。例えば、バイオセンサは、絶縁性の基板上にスクリーン印刷などの方法で作用極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体を含む酵素反応層を形成したものなどがある。

糖尿病患者が年々増加しており、病院のみならず在宅でも利用可能でかつ簡便な血糖の測定方法および血糖値の管理手段が求められている。現在、血糖測定用として、簡易型のグルコースセンサが使用されているが、こうしたセンサに広く使用されているグルコースオキシダーゼは、溶存酸素濃度によって測定値に誤差が生じる可能性が高い。また、グルコース脱水素酵素は反応に平衡反応が含まれているため、微量のグルコースを測定しにくい欠点があった。

【0005】

溶存酸素濃度の影響を受けず、かつNAD(P)非存在下においてグルコースに作用する酵素として、ピロロキノリンキノン(PPQ)を補酵素とするグルコース脱水素酵素が知られているが、該PPQは酵素と解離しやすいという問題点があった。さらに、PPQを補酵素とするグルコース脱水素酵素(特許文献1～2参照)は、グルコースに対する選択性が低いという欠点があった。また、大腸菌(*Escherichia coli*)由来PPQを補酵素とす

るグルコース脱水素酵素(特許文献3参照)、シュードモナス・エスピー(*Pseudomonas* sp.)由来ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素(非特許文献1参照)、およびグルコノバクター・サブオキシダンス(*Gluconobacter suboxydans*)由来ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素(非特許文献2参照)のマルトースに対する作用性は、それぞれ3%、3.2%、5%であるが、菌体の膜画分に存在しているため、可溶化による酵素の抽出操作が必要という煩雑性があった。

【0006】

また、グルコースの3位の水酸基を酸化する補酵素結合型グルコース-3-脱水素酵素(非特許文献3~6参照)があるが、いずれもグルコースに対する選択性が低い。マルトースは輸液成分として広く使用されており、輸液を投与した患者の血中マルトース濃度は高いため、グルコースに特異的に作用し、特にマルトースへの作用性が低い血糖測定用酵素の開発が望まれていた。

【0007】

【特許文献1】特開2000-350588号

【特許文献2】特開2001-197888号

【特許文献3】特開平10-243786号

【非特許文献1】*Agric. Biol. Chem.* (1980)44:1505-1512

【非特許文献2】*Agric. Biol. Chem.* (1981)45:851-861

【非特許文献3】*J. Biol. Chem.* (1967)242:3665-3672

【非特許文献4】*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999)51:58-64

【非特許文献5】*Appl. Biochem. Biotechnol.* (1996)56:301-310

【非特許文献6】*Enzyme Microb. Technol.* (1998)22:269-274

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、前記した事情に鑑み、当業界における要望に応えるためになされたものであって、グルコース脱水素酵素の提供に関し、特にマルトースへの作用性が低い酵素であり、該酵素の用途としてグルコースの消去方法、定量方法、有機化合物の製造方法と多彩に使用することができる。本発明は、よりすぐれたグル

コース脱水素酵素を新たに開発する目的でなされたものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明は、前記課題を解決するためになされたものであって、本発明者らは、各方面から検討した結果、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素に着目した。該補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、電子受容体存在下でグルコースを酸化する反応を触媒し、例えば、EC（酵素番号）1.1.99に分類される酵素である。さらに、本発明者らは、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生産する各種微生物を鋭意検索した結果、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産微生物および補酵素結合型グルコース脱水素酵素を見出した。

【0010】

本発明は、触媒反応時において、補酵素が常に結合したグルコース脱水素酵素を提供する。該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の理化学的性質は、電子受容体存在下で、グルコース、特にグルコースの1位の水酸基を酸化する反応を触媒する。該補酵素結合型グルコース脱水素酵素はマルトースへの作用性が5%以下、好ましくは3%以下であり、マルトースへの作用性が低い。また、1,10-フェナントロリンで阻害される性質を有し、終濃度50mMの1,10-フェナントロリンで50%以上阻害され、好ましくは5mM 1,10-フェナントロリンで50%以上阻害され、より好ましくは1mM 1,10-フェナントロリンで50%以上阻害される。また、50mM クエン酸・ナトリウム緩衝液(pH5.5)存在下において、50℃で15分の熱処理後も85%以上の残存酵素活性率を有する。本発明のグルコース脱水素酵素に結合する補酵素は、例えばフラビン化合物であればよく、例えばフラビンアデニンジヌクレオチドなどの補酵素である。また、本発明は、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の性質および/または実質的に同等な性質を有するタンパク質またはその塩について、該タンパク質をコードするアミノ酸配列あるいは当該配列に1またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、置換もしくは付加による変異を含むアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的に活性で安定なタンパク質を含む。さらに、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、微生物由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素であり、好ましくは真

核微生物由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素、より好ましくは寄託菌株 F E R M P - 1 9 1 0 3 由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素である。

【 0 0 1 1 】

TCHAN-GI BAK(BIOCHEMICA ET BIOPHYSICA ACTA. (1967)139:277-293)に報告のあるアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)の細胞質画分および培養液中に、フラビンアデニンジヌクレオチドを補酵素とするグルコース脱水素酵素の存在が確認されている。しかし、該グルコース脱水素酵素は重金属イオンのみで阻害され、1,10-フェナントロリンを含む金属キレーターで阻害されないという特徴の理化学的性質を有する。このことは、該グルコース脱水素酵素を使用した測定系における反応停止試薬として、重金属以外は使用できず、反応停止後の重金属廃液の処理が煩雑であるといった問題を有している。そこで、本発明で見出した補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、その特徴の一つとして、重金属イオンの他、1,10-フェナントロリンで阻害されるため反応停止などの作業が簡便という性質を有している。

【 0 0 1 2 】

本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法を提供する。

本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素生産能を有する微生物を提供する。好ましくは真核微生物であり、より好ましくはアスペルギルス(*Aspergillus*)属、アスペルギルス テレウス(*Aspergillus terreus*)であり、最も好ましくは寄託菌株 F E R M P - 1 9 1 0 3 である。

本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した方法を提供する。好ましくは試料中のグルコースの測定に際し、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用したグルコースの測定方法である。補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用したグルコースの消去方法および有機化合物の製造方法である。

本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有する試薬を提供する。好ましくは、試料中のグルコースの測定に際し、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有するグルコースの測定試薬である。補酵素結合型グル

コース脱水素酵素を含有するグルコースの消去試薬および有機化合物の製造試薬である。

本発明は、新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有する試薬組成物を提供する。好ましくは、試料中のグルコースの測定に際し、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有するグルコースの測定組成物である。補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含有するグルコースの消去組成物および有機化合物の製造用原料である。

本発明は新規な可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用するバイオセンサを提供し、試料中の特定成分を定量および/または定性可能なバイオセンサを提供する。好ましくは、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用したグルコースセンサである。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、例えば、EC（酵素番号）1.1.9.9に分類される酵素であり、好ましくはEC1.1.9.9.10、1.1.9.9.13、1.1.9.9.17で示される酵素であればよく、補酵素結合型の酵素であり、好ましくは可溶性の補酵素結合型酵素である。つまり、酵素の抽出および/または精製過程で界面活性剤を使用することなく、水溶液の状態で取出し得る酵素である。ここでいう補酵素とは、フラビン化合物であればよく、フラビンアデニンジヌクレオチド、フラビンモノヌクレオチドなどが挙げられる。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、触媒反応時において、補酵素が常に結合したグルコース脱水素酵素であればよい。該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の理化学的性質は、少なくとも以下の性質を有する。電子受容体存在下でグルコースを酸化する反応を触媒し、特にグルコースの1位の水酸基を酸化する反応を触媒する。マルトースへの作用性は5%以下、好ましくは3%以下でありマルトースへの作用性が低い。終濃度50mM 1,10-フェナントロリンで50%以上阻害され、好ましくは5mM 1,10-フェナントロリンで50%以上阻害され、より好ましくは1mM 1,10-フェナントロリンで50%以上、より最適には1mM 1,10-フェナントロリンで60%以上阻害される。5

0 mM クエン酸・ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 存在下において、50℃で15分の熱処理後も85%以上の残存酵素活性率を有する。また、本発明は、上述する理化学的性質を有する補酵素結合型グルコース脱水素酵素に関し、または該補酵素結合型グルコース脱水素酵素と実質的に同等な活性を有するタンパク質またはその塩について、該タンパク質をコードするアミノ酸配列あるいは当該配列に1またはそれ以上のアミノ酸残基の欠失、置換もしくは付加による変異を含むアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的に活性で安定なタンパク質および塩であり、該理化学的性質をコードするアミノ酸配列に関する。

【0014】

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素であるタンパク質およびその塩は、上記理化学的性質を有する微生物由来が好ましい。本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の由来となる微生物、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産能を有する微生物としては、例えば、原核生物に属するアーカンギウム (Archangium) 属、アーケオグロバス (Archaeoglobus) 属、アーセノフォナス (Arsenophonus) 属、アーレンシア (Ahrensia) 属、アウレオバクテリウム (Aureobacterium) 属、アエロコッカス (Aerococcus) 属、アエロピルム (Aeropyrum) 属、アエロミクロビウム (Aeromicrobium) 属、アエロモナス (Aeromonas) 属、アキフェクス (Aquifex) 属、アクアスピリラム (Aquaspirillum) 属、アクアバクター (Aquabacter) 属、アクアバクテリウム (Aquabacterium) 属、アクアミクロビウム (Aquamicrobium) 属、アクチノアロテイクス (Actinoalloteichus) 属、アクチノキネオスポラ (Actinokineospora) 属、アクチノコラリア (Actinocorallia) 属、アクチノシネマ (Actinosynnema) 属、アクチノスポランギウム (Actinosporangium) 属、アクチノバクルム (Actinobaculum) 属、アクチノバチルス (Actinobacillus) 属、アクチノピクニジウム (Actinopycnidium) 属、アクチノビスポラ (Actinobispora) 属、アクチノプラネス (Actinoplanes) 属、アクチノポリスポラ (Actinopolyspora) 属、アクチノポリモルファ (Actinopolymorpha) 属、アクチノマイセス (Actinomyces) 属、アクチノマジュラ (Actinomadura) 属、アクロカルポスポラ (Acrocarpospora) 属、アグロコッカス (Agrococcus) 属、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、アグロマイセス (Agromyces) 属、アクロマチウム (Achromatium) 属、アグロモナス (Agromonas)

onas)属、アクロモバクター(*Achromobacter*)属、アコレプラズマ(*Acholeplasma*)属、アサイア(*Asaia*)属、アシジアヌス(*Acidianus*)属、アシジスファエラ(*Acidisphaera*)属、アシジフィリウム(*Acidiphilium*)属、アシジミクロビウム(*Acidimicrobium*)属、アシジロバス(*Acidilobus*)属、アシダミノコッカス(*Acidaminococcus*)属、アシダミノバクター(*Acidaminobacter*)属、アシヂチオバチルス(*Acidithiobacillus*)属、アジトコッカス(*Agitococcus*)属、アシドサーマス(*Acidothermus*)属、アシドセラ(*Acidocella*)属、アシドバクテリウム(*Acidobacterium*)属、アシドボラクス(*Acidovorax*)属、アシドモナス(*Acidomonas*)属、アシネトバクター(*Acinetobacter*)属、アスチカコーリス(*Asticcacaulis*)属、アステロレプラズマ(*Asteroleplasma*)属、アセチトマクラム(*Acetitomaculum*)属、アセチビブリオ(*Acetivibrio*)属、アセトアナエロビウム(*Acetoanaerobium*)属、アセトゲニウム(*Acetogenium*)属、アセトサーマス(*Acetothermus*)属、アセトネマ(*Acetonema*)属、アセトバクター(*Acetobacter*)属、アセトバクテリウム(*Acetobacterium*)属、アセトハロビウム(*Acetohalobium*)属、アセトフィラメントム(*Acetofilamentum*)属、アセトミクロビウム(*Acetomicrobium*)属、アゾアーカス(*Azoarcus*)属、アゾスピラ(*Azospira*)属、アゾスピリラム(*Azospirillum*)属、アゾトバクター(*Azotobacter*)属、アゾネクサス(*Azonexus*)属、アゾビブリオ(*Azovibrio*)属、アゾモナス(*Azomonas*)属、アゾモノトリコン(*Azomonotrichon*)属、アゾリゾビウム(*Azorhizobium*)属、アゾリゾフィラス(*Azorhizophilus*)属、アトポバクター(*Atopobacter*)属、アトポビウム(*Atopobium*)属、アナプラズマ(*Anaplasma*)属、アニューリニバチルス(*Aneurinibacillus*)属、アネロアルカス(*Anaeroarcus*)属、アネロコッカス(*Anaerococcus*)属、アネロシナス(*Anaerosinus*)属、アネロバクター(*Anaerobacter*)属、アネロバクルム(*Anaerobaculum*)属、アネロビオスピリラム(*Anaerobiospirillum*)属、アネロビブリオ(*Anaerovibrio*)属、アネロフィルム(*Anaerofilum*)属、アネロプラズマ(*Anaeroplasma*)属、アネロブランカ(*Anaerobranca*)属、アネロボラクス(*Anaerovorax*)属、アネロムサ(*Anaeromusa*)属、アネロラブダス(*Anaerorhabdus*)属、アノキシバチルス(*Anoxybacillus*)属、アビオトロフィア(*Abiotrophia*)属、アフイピア(*Afipia*)属、アマリコッカス(*Amaricoccus*)属、アミコラタ(*Amycolata*)属、アミコラトプシス(*Amycolatopsis*)属、アミノバクター(A

minobacter)属、アミノバクテリウム(Aminobacterium)属、アミノモナス(Aminomonas)属、アメボバクター(Amoebobacter)属、アモニフィラス(Ammoniphilus)属、アモニフェクス(Ammonifex)属、アモルフォスポランギウム(Amorphosporangium)属、アラクニア(Arachnia)属、アリシエラ(Alysiella)属、アリシクロバチルス(Alicyclobacillus)属、アリシュワネラ(Alishewanella)属、アルカニボラクス(Alcanivorax)属、アルカノバクテリウム(Arcanobacterium)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、アルカリバクテリウム(Alkalibacterium)属、アルカリフィラス(Alkaliphilus)属、アルコバクター(Arcobacter)属、アルスロバクター(Arthrobacter)属、アルテロコッカス(Alterococcus)属、アルテロモナス(Alteromonas)属、アルビバクター(Albibacter)属、アロイオコッカス(Alloiococcus)属、アロクロマティウム(Allochromatium)属、アロドモナス(Arhodomonas)属、アロモナス(Allomonas)属、アロリゾビウム(Allorhizobium)属、アンカロクロリス(Ancalochloris)属、アンカロミクロビウム(Ancalomicrobium)属、アンギオコッカス(Angiococcus)属、アングロミクロビウム(Angulomicrobium)属、アンシロバクター(Ancylobacter)属、アンタクトバクター(Antarctobacter)属、アンフィバチルス(Amphibacillus)属、アンプラリエラ(Ampullariella)属、イグナビグラナム(Ignavigranum)属、イジオマリナ(Idiomarina)属、イソクロマチウム(Isochromatium)属、イソスフェエラ(Isosphaera)属、イデオネラ(Ideonella)属、イリオバクター(Ilyobacter)属、イントラスポランギウム(Intrasporangium)属、ウィークセラ(Weeksellia)属、ウィグルスワーシア(Wigglesworthia)属、ウィリアムシア(Williamsia)属、ウォリネラ(Wolinella)属、ウォルバキア(Wolbachia)属、ウレアプラズマ(Ureaplasma)属、ウレイバチルス(Ureibacillus)属、エイケネラ(Eikenella)属、エーリキア(Ehrlichia)属、エクシグオバクテリウム(Exiguobacterium)属、エクセロスポラ(Excellospora)属、エクトチオロドスピラ(Ectothiorhodospira)属、エジプシアネラ(Aegyptianella)属、エッガーセラ(Eggerthella)属、エッシェリヒア(Escherichia)属、エドワードシエラ(Edwardsiella)属、エビングセラ(Ewingella)属、エベリスロゾーン(Eperythrozoon)属、エリシペロスリクス(Erysipelothrix)属、エリスロバクター(Erythrobacter)属、エリスロミクロビウム(Erythromicrobium)属、エリスロモナス(Erythromonas)属、エリトロス

ポランギウム (*Elytrosporangium*) 属、エルシニア (*Yersinia*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、エレモコッカス (*Eremococcus*) 属、エンシファー (*Ensifer*) 属、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、エントモプラズマ (*Entomoplasma*) 属、エンヒドロバクター (*Enhydrobacter*) 属、エンペドバクター (*Empedobacter*) 属、オエノコッカス (*Oenococcus*) 属、オエルスコビア (*Oerskovia*) 属、オーシャニモナス (*Oceanimonas*) 属、オーシャノスピリラム (*Oceanospirillum*) 属、オキサロバクター (*Oxalobacter*) 属、オキサロファガス (*Oxalophagus*) 属、オキソバクター (*Oxobacter*) 属、オクタデカバクター (*Octadecabacter*) 属、オクロバクトラム (*Ochrobactrum*) 属、オシロクロリス (*Oscillochloris*) 属、オシロスピラ (*Oscillospira*) 属、オベスムバクテリウム (*Obesumbacterium*) 属、オリエンチア (*Orientia*) 属、オリゲラ (*Oligella*) 属、オリゴトロファ (*Oligotrophia*) 属、オリバクトラム (*Oribaculum*) 属、オルニチニコッカス (*Ornithinococcus*) 属、オルニチニミクロビウム (*Ornithinimicrobium*) 属、オルニトバクテリウム (*Ornithobacterium*) 属、オレニア (*Orenia*) 属、ガードネレラ (*Gardnerella*) 属、カーニモナス (*Carnimonas*) 属、カーノバクテリウム (*Carnobacterium*) 属、カウチオプラネス (*Couchioplanes*) 属、カウドリア (*Cowdria*) 属、カウロバクター (*Caulobacter*) 属、カセオバクター (*Caseobacter*) 属、カテニバクテリウム (*Catenibacterium*) 属、カテニューロプラネス (*Catenuloplanes*) 属、カテノコッカス (*Catenococcus*) 属、カテラトスポラ (*Catellatospora*) 属、カトネラ (*Catonella*) 属、カプスラリス (*Capsularis*) 属、カプノシトファーガ (*Capnocytophaga*) 属、ガリオネラ (*Gallionella*) 属、カリオファノン (*Caryophanon*) 属、ガリコラ (*Gallicola*) 属、カリマトバクテリウム (*Calymmatobacterium*) 属、カルディオバクテリウム (*Cardiobacterium*) 属、カルディセルロシラプター (*Caldicellulosiruptor*) 属、カルディバーガ (*Calddivirga*) 属、カルデロバクテリウム (*Calderobacterium*) 属、カルボキシジブラキウム (*Carboxydibrachium*) 属、カルボキシドサーマス (*Carboxydotherrmus*) 属、カルボフィラス (*Carbophilus*) 属、カロラマター (*Caloramator*) 属、キサントバクター (*Xanthobacter*) 属、キサントモナス (*Xanthomonas*) 属、キシレラ (*Xylella*) 属、キシロフィラス (*Xylophilus*) 属、キセノラプダス (*Xenorhabdus*) 属、キタサトア (*Kitasatoa*) 属、キタサトスポラ (*Kitasatospora*) 属、キチノファーガ (*Chitinophaga*)

phaga) 属、キトコッカス (*Kytococcus*) 属、キネオコッカス (*Kineococcus*) 属、キネオスポリア (*Kineosporia*) 属、キネラ (*Quinella*) 属、キブデロスポランギウム (*Kibdelosporangium*) 属、キャンピロバクター (*Campylobacter*) 属、キングラ (*Kingella*) 属、クツネリア (*Kutzneria*) 属、クプリアビダス (*Cupriavidus*) 属、クラウロコッカス (*Craurococcus*) 属、グラシエコラ (*Glaciecocola*) 属、グラシリバチルス (*Gracilibacillus*) 属、グラニューリカテラ (*Granulicatella*) 属、グラハメラ (*Grahamella*) 属、クラビバクター (*Clavibacter*) 属、クラミジア (*Chlamydia*) 属、クラミドフィラ (*Chlamydophila*) 属、クリオバクテリウム (*Cryobacterium*) 属、グリコマイセス (*Glycomyces*) 属、クリシオゲネス (*Chrysiogenes*) 属、クリスチスピラ (*Cristispira*) 属、クリセオバクテリウム (*Chryseobacterium*) 属、クリセオモナス (*Chryseomonas*) 属、クリナリウム (*Crinalium*) 属、クリプトスポランギウム (*Cryptosporangium*) 属、クリプトバクテリウム (*Cryptobacterium*) 属、クリベラ (*Kluyvera*) 属、クリベラ (*Kribbella*) 属、グルコナセトバクター (*Gluconacetobacter*) 属、グルコノバクター (*Gluconobacter*) 属、クルチア (*Kurthia*) 属、クルトバクテリウム (*Curtobacterium*) 属、クレノスリクス (*Crenothrix*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、クレベランジナ (*Clevelandina*) 属、クロシエレラ (*Crossiella*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、グロビカテラ (*Globicatella*) 属、クロマティウム (*Chromatium*) 属、クロモバクテリウム (*Chromobacterium*) 属、クロモハロバクター (*Chromohalobacter*) 属、クロロネマ (*Chloronema*) 属、クロロビウム (*Chlorobium*) 属、クロロフレクサス (*Chloroflexus*) 属、クロロヘルペトン (*Chloroherpeton*) 属、ケディバクター (*Caedibacter*) 属、ケトグロニシゲニウム (*Ketogulonigenium*) 属、ゲマータ (*Gemmata*) 属、ゲミガー (*Gemmiger*) 属、ゲメラ (*Gemella*) 属、ゲモバクター (*Gemmobacter*) 属、ケラトコッカス (*Chelatococcus*) 属、ケラトバクター (*Chelatobacter*) 属、ゲリジバクター (*Gelidibacter*) 属、コエノニア (*Coenonia*) 属、コクシエレラ (*Coxiella*) 属、コクリア (*Kocuria*) 属、コセレラ (*Koserella*) 属、コプロコッカス (*Coprococcus*) 属、コプロサーモバクター (*Coprothermobacter*) 属、コプロバチルス (*Coprobacillus*) 属、コマモナス (*Comamonas*) 属、コリオバクテリウム (*Coriobacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、コリンセラ (*Collinsella*) 属、コルウェリア (*Colwellia*) 属、ゴルドニア (*Gordonia*) 属

nia)属、コングロメロモナス(*Conglomeromonas*)属、コンドロマイセス(*Chondromyces*)属、サーマエロバクター(*Thermaerobacter*)属、サーマス(*Thermus*)属、サーマセトゲニウム(*Thermacetogenium*)属、サーマネロビブリオ(*Thermanaerovibrio*)属、サーミカヌス(*Thermicanus*)属、サーミチオバチルス(*Thermithiobacillus*)属、サーモアクチノマイセス(*Thermoactinomyces*)属、サーモアナエロバクター(*Thermoanaerobacter*)属、サーモアナエロバクテリウム(*Thermoanaerobacterium*)属、サーモアナエロビウム(*Thermoanaerobium*)属、サーモクラヂウム(*Thermocladium*)属、サーモクリスパム(*Thermocrispum*)属、サーモクリニス(*Thermocrinis*)属、サーモクロマチウム(*Thermochromatium*)属、サーモコッカス(*Thermococcus*)属、サーモシフォ(*Thermosipho*)属、サーモシントロファ(*Thermosyntropha*)属、サーモスフェラ(*Thermosphaera*)属、サーモスリクス(*Thermothrix*)属、サーモデスルフォバクテリウム(*Thermodesulfobacterium*)属、サーモデスルフォビブリオ(*Thermodesulfovibrio*)属、サーモデスルフォラブダス(*Thermodesulforhabdus*)属、サーモテラバクテリウム(*Thermoterrabacterium*)属、サーモトガ(*Thermotoga*)属、サーモネマ(*Thermonema*)属、サーモハイドロゲニウム(*Thermohydrogenium*)属、サーモバクテロイデス(*Thermobacteroides*)属、サーモバチルス(*Thermobacillus*)属、サーモハロバクター(*Thermohalobacter*)属、サーモビスポラ(*Thermobispora*)属、サーモビフィダ(*Thermobifida*)属、サーモフィルム(*Thermofilum*)属、サーモブラキウム(*Thermobrachium*)属、サーモプラズマ(*Thermoplasma*)属、サーモプロテウス(*Thermoproteus*)属、サーモミクロビウム(*Thermomicrobium*)属、サーモモノスポラ(*Thermomonospora*)属、サーモレオフィラム(*Thermoleophilum*)属、サイトファーガ(*Cytophaga*)属、ザイモバクター(*Zymobacter*)属、ザイモフィラス(*Zymophilus*)属、ザイモモナス(*Zymomonas*)属、サギツツラ(*Sagittula*)属、サッカロコッカス(*Saccharococcus*)属、サッカロスリクス(*Saccharothrix*)属、サッカロバクター(*Saccharobacter*)属、サッカロポリスポラ(*Saccharopolyspora*)属、サッカロモノスポラ(*Saccharomonospora*)属、ザバルジニア(*Zavarzinia*)属、サブテルコラ(*Subtercola*)属、サプロスピラ(*Saprospira*)属、サムソニア(*Samsonia*)属、サリニコッカス(*Salinicoccus*)属、サリニビブリオ(*Salinivibrio*)属、サリバチルス(*Salibacillus*)属、サルコビウム(*Sarcobium*)属、サルチナ(*Sarc*

ina)属、サルモネラ (Salmonella)属、サレゲンチバクター (Salegentibacter)属、サンギバクター (Sanguibacter)属、サンダラシノバクター (Sandaracinobacter)属、ジアドバクター (Dyadobacter)属、ジアリスター (Dialister)属、ジエッチア (Dietzia)属、シェワネラ (Shewanella)属、ジオスリクス (Geothrix)属、ジオダーマトフィラス (Geodermatophilus)属、ジオトガ (Geotoga)属、ジオバクター (Geobacter)属、ジオバチルス (Geobacillus)属、ジオビブリオ (Geovibrio)属、ジクチオグロムス (Dictyoglomus)属、シクロクラスチカス (Cycloclasticus)属、シクロセルペンス (Psychroserpens)属、シクロバクター (Psychrobacter)属、シクロバクテリウム (Cyclobacterium)属、シクロフレキサス (Psychroflexus)属、シクロモナス (Psychromonas)属、シゲラ (Shigella)属、ジケロバクター (Dichelobacter)属、ジコトミクロビウム (Dichotomicrobium)属、ジスゴノモナス (Dysgonomonas)属、シストバクター (Cystobacter)属、シトロバクター (Citrobacter)属、シナギステス (Synergistes)属、シノリゾビウム (Sinorhizobium)属、ジプロカリクス (Diplocalyx)属、シムカニア (Simkania)属、シモンシエラ (Simonsiella)属、ジャニバクター (Janibacter)属、ジャンチノバクテリウム (Janthinobacterium)属、シューダミノバクター (Pseudaminobacter)属、シュードアマミコラタ (Pseudomycolata)属、シュードアルテロモナス (Pseudoalteromonas)属、シュードキシアントモナス (Pseudoxanthomonas)属、シュードケジバクター (Pseudocaedibacter)属、シュードノカルジア (Pseudonocardia)属、シュードブチリビブリオ (Pseudobutyrvibrio)属、シュードモナス (Pseudomonas)属、シュードラミバクター (Pseudoramibacter)属、シュバルチア (Schwartzia)属、ジョネシア (Jonesia)属、ジョンソネラ (Johnsonella)属、シリシバクター (Silicibacter)属、シントロファス (Syntrophus)属、シントロフォコッカス (Syntrophococcus)属、シントロフォサーマス (Syntrophothermus)属、シントロフォスポラ (Syntrophospora)属、シントロフォバクター (Syntrophobacter)属、シントロフォボツルス (Syntrophobotulus)属、シントロフォモナス (Syntrophomonas)属、シンビオテス (Symbiotes)属、シンビオバクテリウム (Symbiobacterium)属、ズーグロエア (Zoogloea)属、ズガネラ (Duganella)属、スキネリア (Schineria)属、スクシニクラスチカム (Succiniclasticum)属、スクシニスピラ (Succinispira)属、スクシニビブリオ (Succinivibr

io)属、スクシニモナス (*Succinimonas*)属、スケルマニア (*Skermania*)属、スケルマネラ (*Skermanella*)属、スターケヤ (*Starkeya*)属、スタツピア (*Stappia*)属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*)属、スタフィロサーマス (*Staphylothermus*)属、スタレヤ (*Staleyia*)属、スチギオロバス (*Stygiolobus*)属、スチビオバクター (*Stibiobacter*)属、ステイグマテラ (*Stigmatella*)属、ステテリア (*Stetteria*)属、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*)属、ステラ (*Stella*)属、ステレラ (*Sutterella*)属、ストネラ (*Suttonella*)属、ストマトコッカス (*Stomatococcus*)属、ストレプトアロテイクス (*Streptoalloteichus*)属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)属、ストレプトスポランギウム (*Streptosporangium*)属、ストレプトバーチシリウム (*Streptoverticillium*)属、ストレプトバチルス (*Streptobacillus*)属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)属、ストレプトモノスポラ (*Streptomonospora*)属、スピリラム (*Spirillum*)属、スピリリプラネス (*Spirilliplanes*)属、スピリロスポラ (*Spirillospora*)属、スピロソーマ (*Spirosoma*)属、スピロプラズマ (*Spiroplasma*)属、スピロヘータ (*Spirochaeta*)属、スフィンゴバクテリウム (*Sphingobacterium*)属、スフィンゴビウム (*Sphingobium*)属、スフィンゴピクシス (*Sphingopyxis*)属、スフェロチラス (*Sphaerotilus*)属、スフェロバクター (*Sphaerobacter*)属、スフェンゴモナス (*Sphingomonas*)属、スポリクチャ (*Sporichthya*)属、スポロサイトファーガ (*Sporocytophaga*)属、スポロサルチナ (*Sporosarcina*)属、スポロトマクulum (*Sporotomaculum*)属、スポロバクター (*Sporobacter*)属、スポロバクテリウム (*Sporobacterium*)属、スポロハロバクター (*Sporohalobacter*)属、スポロムサ (*Sporomusa*)属、スポロラクトバチルス (*Sporolactobacillus*)属、スミセラ (*Smithella*)属、スラッキア (*Slackia*)属、スルフイトバクター (*Sulfitobacter*)属、スルフォバチルス (*Sulfobacillus*)属、スルフォフォボコッカス (*Sulfophobococcus*)属、スルフォロバス (*Sulfolobus*)属、スルフリスフェラ (*Sulfurisphaera*)属、スルフロコッカス (*Sulfurococcus*)属、スルフロスピリラム (*Sulfurospirillum*)属、セデセア (*Cedecea*)属、セトバクテリウム (*Cetobacterium*)属、セバルデラ (*Sebaldella*)属、セラチア (*Serratia*)属、セリベリア (*Seliberia*)属、セルビブリオ (*Cellvibrio*)属、セルプラ (*Serpula*)属、セルプリナ (*Serpulina*)属、セルペンス (*Serpens*)属、セルロシマイクロビウム (*Cellulosimicrobium*)属

、セルロファーガ(*Cellulophaga*)属、セルロモナス(*Cellulomonas*)属、セレンハラネロバクター(*Selenihalanaerobacter*)属、セレンモナス(*Selenomonas*)属、センチピーダ(*Centipeda*)属、ソダリス(*Sodalis*)属、ゾベリア(*Zobellia*)属、ソロバクテリウム(*Solobacterium*)属、タウエラ(*Thauera*)属、ダクチロスポランギウム(*Dactylosporangium*)属、タツメラ(*Tatumella*)属、タトロキア(*Tatlockia*)属、タラソモナス(*Thalassomonas*)属、チアルカリコッカス(*Thi alkalalicoccus*)属、チアルカリビブリオ(*Thi alkalivibrio*)属、チアルカリミクロビウム(*Thi alkalimicrobium*)属、チオカプサ(*Thiocapsa*)属、チオコッカス(*Thiococcus*)属、チオジクチオン(*Thiodictyon*)属、チオシステイス(*Thiocystis*)属、チオスピラ(*Thiospira*)属、チオスピリラム(*Thiospirillum*)属、チオスフェラ(*Thiosphaera*)属、チオスリクス(*Thiothrix*)属、チオバクテリウム(*Thiobacterium*)属、チオバチルス(*Thiobacillus*)属、チオハロカプサ(*Thiohalocapsa*)属、チオフラビコッカス(*Thioflavicoccus*)属、チオブラム(*Thiovulum*)属、チオプロカ(*Thioploca*)属、チオペジア(*Thiopedia*)属、チオマルガリータ(*Thiomargarita*)属、チオミクロスピラ(*Thiomicrospira*)属、チオモナス(*Thiomonas*)属、チオランプロブム(*Thiolamprovum*)属、チオロドコッカス(*Thiorhodococcus*)属、チオロドスピラ(*Thiorhodospira*)属、チオロドビブリオ(*Thiorhodovibrio*)属、チシエレラ(*Tissierella*)属、チャイニア(*Chainia*)属、チンダリア(*Tindallia*)属、ツカムレラ(*Tsukamurella*)属、ツリセラ(*Turicella*)属、デイノコッカス(*Deinococcus*)属、デイノバクター(*Deinobacter*)属、テイロレラ(*Taylorella*)属、テクチバクター(*Tectibacter*)属、デクロロソーマ(*Dechlorosoma*)属、デクロロモナス(*Dechloromonas*)属、テサラコッカス(*Tessaracoccus*)属、デスルファシナム(*Desulfacinum*)属、デスルフィトバクテリウム(*Desulfitobacterium*)属、デスルフォカプサ(*Desulfocapsa*)属、デスルフォコッカス(*Desulfococcus*)属、デスルフォサルチナ(*Desulfosarcina*)属、デスルフォスピラ(*Desulfospira*)属、デスルフォスポロシナス(*Desulfosporosinus*)属、デスルフォセラ(*Desulfocella*)属、デスルフォタレア(*Desulfotalea*)属、デスルフォチグナム(*Desulfotignum*)属、デスルフォトマクラム(*Desulfotomaculum*)属、デスルフォナトロナム(*Desulfonatronum*)属、デスルフォナトロノビブリオ(*Desulfonatronovibrio*)属、デスルフォニスポラ(*Desulfonispora*)属、

デスルフォネマ(Desulfonema)属、デスルフォバーガ(Desulfovira)属、デスル
フォバクター(Desulfobacter)属、デスルフォバクテリウム(Desulfobacterium)
属、デスルフォバクラ(Desulfobacula)属、デスルフォバッカ(Desulfobacca)属
、デスルフォバルバス(Desulfobulbus)属、デスルフォハロビウム(Desulfohalob
ium)属、デスルフォビブリオ(Desulfovibrio)属、デスルフォファステイス(Desu
lfofustis)属、デスルフォファバ(Desulfofaba)属、デスルフォフリガス(Desulf
ofrigus)属、デスルフォミクロビウム(Desulfomicrobium)属、デスルフォモナス
(Desulfomonas)属、デスルフォモニレ(Desulfomonile)属、デスルフォラブダス(
Desulforhabdus)属、デスルフォロパルス(Desulforhopalus)属、デスルフレラ(D
esulfurella)属、デスルフロコッカス(Desulfurococcus)属、デスルフロバクテ
リウム(Desulfurobacterium)属、デスルフロムサ(Desulfuromusa)属、デスルフ
ロモナス(Desulfuromonas)属、デスルフロロバス(Desulfurolobus)属、デセンジ
ア(Desemzia)属、デチオスルフォビブリオ(Dethiosulfovibrio)属、テトラゲノ
コッカス(Tetragenococcus)属、テトラスフェラ(Tetrasphaera)属、デニトロバ
クテリウム(Denitrobacterium)属、デニトロビブリオ(Denitrovibrio)属、デハ
ロバクター(Dehalobacter)属、テピジモナス(Tepidimonas)属、デフェリバクタ
ー(Deferribacter)属、デフラビバクター(Defluviobacter)属、デボシア(Devosia
)属、デメトリア(Demetria)属、テラコッカス(Terracoccus)属、テラバクター(T
errabacter)属、デルクシア(Derxia)属、デルフチア(Delftia)属、デルマコッカ
ス(Dermacoccus)属、デルマトフィラス(Dermatophilus)属、デルマバクター(Der
mabacter)属、テルリア(Telluria)属、デレヤ(Deleya)属、デンドロスポロバク
ター(Dendrosporobacter)属、トキソスリクス(Toxothrix)属、トラブルシエラ(T
rabulsiella)属、トリクロロバクター(Trichlorobacter)属、トリココッカス(Tr
ichococcus)属、トルモナス(Tolumonas)属、トレポネマ(Treponema)属、ドロシ
グラヌラム(Dolosigranulum)属、ドロシコッカス(Dolosicoccus)属、トロフェリ
マ(Tropheryma)属、ナイセリア(Neisseria)属、ナトリアルバ(Natrialba)属、ナ
トリネマ(Natrinema)属、ナトロニエレラ(Natroniella)属、ナトロニンコラ(Nat
ronincola)属、ナトロノコッカス(Natronococcus)属、ナトロノバクテリウム(Na
tronobacterium)属、ナトロノモナス(Natronomonas)属、ナトロノルブルム(Natr

onorubrum) 属、ナノシステイス (Nannocystis) 属、ニトロコッカス (Nitrococcus) 属、ニトロスピナ (Nitrospina) 属、ニトロスピラ (Nitrospira) 属、ニトロソコッカス (Nitrosococcus) 属、ニトロソスピラ (Nitrosospira) 属、ニトロソモナス (Nitrosomonas) 属、ニトロソロバス (Nitrosolobus) 属、ニトロバクター (Nitrobacter) 属、ネオクラミジア (Neochlamydia) 属、ネオリケッチア (Neorickettsia) 属、ネステレンコニア (Nesterenkonia) 属、ネブスキア (Nevskia) 属、ネプツノモナス (Neptunomonas) 属、ノカルジア (Nocardia) 属、ノカルジオイデス (Nocardioides) 属、ノカルジオプシス (Nocardiopsis) 属、ノノムラエア (Nonomuraea) 属、ノボスフィンゴビウム (Novosphingobium) 属、バージバチルス (Virgibacillus) 属、ハイドロゲノバクター (Hydrogenobacter) 属、ハイドロゲノビブリオ (Hydrogenovibrio) 属、ハイドロゲノファーガ (Hydrogenophaga) 属、ハイドロゲノフィラス (Hydrogenophilus) 属、ハイパーサーマス (Hyperthermus) 属、ハイフォミクロビウム (Hyphomicrobium) 属、ハイフォモナス (Hyphomonas) 属、パウシモナス (Paucimonas) 属、バクテリオネマ (Bacterionema) 属、バクテリオボラクス (Bacteriovorax) 属、バクテロイデス (Bacteroides) 属、バクトデルマ (Bactoderma) 属、バゴコッカス (Vagococcus) 属、パスツリア (Pasteuria) 属、パスツレラ (Pasteurella) 属、バチルス (Bacillus) 属、パピリバクター (Papillibacter) 属、ハフニア (Hafnia) 属、ハヘラ (Hahella) 属、パラクラウロコッカス (Paracraurococcus) 属、パラクラミジア (Parachlamydia) 属、パラコッカス (Paracoccus) 属、ハラネロバクター (Halanaerobacter) 属、ハラネロビウム (Halanaerobium) 属、パララクトバチルス (Paralactobacillus) 属、バリオボラクス (Variovorax) 属、ハリスコメノバクター (Haliscomenobacter) 属、バルトネラ (Bartonella) 属、バルネアトリクス (Balneatrix) 属、パレオコッカス (Palaeococcus) 属、ハレラ (Hallella) 属、ハロアルキュラ (Haloarcula) 属、ハロインコラ (Haloicola) 属、ハロクロマチウム (Halochromatium) 属、ハロコッカス (Halococcus) 属、ハロサーモスリクス (Halothermothrix) 属、ハロジオメトリカム (Halogeometricum) 属、ハロスピルリナ (Halospirulina) 属、ハロセラ (Halocella) 属、ハロチオバチルス (Halothiobacillus) 属、ハロテリゲナ (Haloterrigena) 属、ハロナトロナム (Halonatronum) 属、ハロバキュラム (Halobaculum) 属、ハロバクテリウム (Halobacterium) 属、ハロバクテロイデス (Ha

lobacteroides)属、ハロバチルス(Halobacillus)属、ハロビブリオ(Halovibrio)属、ハロフェラクス(Haloferax)属、ハロメタノコッカス(Halomethanococcus)属、ハロモナス(Halomonas)属、ハロラブダス(Halorhabdus)属、ハロルブルム(Halorubrum)属、ハロルプロバクテリウム(Halorubrobacterium)属、ハロロドスピラ(Halorhodospira)属、パントエア(Pantoea)属、パンドラエア(Pandora)属、バンピロビブリオ(Vampirovibrio)属、ピクロフィラス(Picrophilus)属、ピシリケッチア(Piscirickettsia)属、ヒッペア(Hippea)属、ビトレオシラ(Vitreoscilla)属、ビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)属、ビブリオ(Vibrio)属、ヒメノバクター(Hymenobacter)属、ピメロバクター(Pimelobacter)属、ピリメリア(Pilimelia)属、ヒルスキア(Hirschia)属、ピレラ(Pirella)属、ピレルラ(Pirellula)属、ピロコッカス(Pyrococcus)属、ピロジクチウム(Pyrodictium)属、ピロチナ(Pillotina)属、ピロバクルム(Pyrobaculum)属、ビロフィラ(Bilophila)属、ピロロバス(Pyrolobus)属、ファエニア(Faenia)属、ファクラミア(Facklamia)属、ファスコラクトバクテリウム(Phascolarctobacterium)属、ファルシビブリオ(Falcivibrio)属、ファンジバクター(Fundibacter)属、フィネゴルジア(Finegoldia)属、フィプロバクター(Fibrobacter)属、フィリバクター(Filibacter)属、フィリファクター(Filifactor)属、フィロバクテリウム(Phyllobacterium)属、フィロバチルス(Filobacillus)属、フィロミクロビウム(Filomicrobium)属、フェオスピリラム(Phaeospirillum)属、フェニロバクテリウム(Phenylobacterium)属、フェリバクテリウム(Ferribacterium)属、フェリモナス(Ferrimonas)属、フェルビドバクテリウム(Fervidobacterium)属、フェログロバス(Ferroglobus)属、フェロプラズマ(Ferroplasma)属、フォコエノバクター(Phocoenobacter)属、フォトバクテリウム(Photobacterium)属、フォトラブダス(Photorhabdus)属、フォルミビブリオ(Formivibrio)属、フソバクテリウム(Fusobacterium)属、ブチアウクセラ(Buttiauxella)属、ブチリビブリオ(Butyrivibrio)属、ブデロビブリオ(Bdellovibrio)属、ブドビシア(Budvicia)属、プフェニジア(Pfennigia)属、ブフネラ(Buchnera)属、フュージバクター(Fusibacter)属、プラウセラ(Prauserella)属、プラギア(Pragia)属、ブラキスピラ(Brachyspira)属、ブラキバクテリウム(Brachybacterium)属、ブラキモナス(Brachymonas)属、ブラストクロリス(Bla

stochloris)属、ブラストコッカス(Blastococcus)属、ブラストバクター(Blastobacter)属、ブラストモナス(Blastomonas)属、ブラタバクテリウム(Blattabacterium)属、ブラディリゾビウム(Bradyrhizobium)属、フラテウリア(Frateuria)属、ブラナメラ(Branhamella)属、プラノコッカス(Planococcus)属、プラノテトラスポラ(Planotetraspora)属、プラノビスポラ(Planobispora)属、プラノポリスポラ(Planopolyspora)属、プラノミクロビウム(Planomicrobium)属、プラノモノスポラ(Planomonospora)属、フラビモナス(Flavimonas)属、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、フラメオバーガ(Flammeovirga)属、フランキア(Frankia)属、プランクトマイセス(Planctomyces)属、フランシセラ(Francisella)属、フリードマニエラ(Friedmanniella)属、フリゴリバクテリウム(Frigoribacterium)属、フルオリバクター(Fluoribacter)属、ブルクホルデリア(Burkholderia)属、ブルセラ(Brucella)属、ブレイジア(Bulleidia)属、フレキシスチペス(Flexistipes)属、フレキシスリクス(Flexithrix)属、フレキシバクター(Flexibacter)属、フレクトバチルス(Flectobacillus)属、プレシオモナス(Plesiomonas)属、ブレネリア(Brenneria)属、ブレバンジモナス(Brevundimonas)属、ブレビネマ(Brevinema)属、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)属、ブレビバチルス(Brevibacillus)属、プレボテラ(Prevotella)属、プロクロコッカス(Prochlorococcus)属、プロクロロスリクス(Prochlorothrix)属、プロクロロン(Prochloron)属、ブロコトリクス(Brochothrix)属、プロステコクロリス(Prosthecochloris)属、プロステコバクター(Prosthecobacter)属、プロステコミクロビウム(Prosthecomicrobium)属、プロテウス(Proteus)属、プロトモナス(Protomonas)属、プロピオニゲニウム(Propionigenium)属、プロピオニスピラ(Propionispira)属、プロピオニスポラ(Propionispora)属、プロピオニバクター(Propionibacter)属、プロピオニバクテリウム(Propionibacterium)属、プロピオニビブリオ(Propionivibrio)属、プロピオニフェラクス(Propioniferax)属、プロビデンシア(Providencia)属、プロミクロモノスポラ(Promicromonospora)属、プロリノボルス(Prolinoborus)属、ベイジリンキア(Beijerinckia)属、ベイロネラ(Veillonella)属、ベウテンベルギア(Beutenbergia)属、ベギアトア(Beggiatoa)属、ペクチナタス(Pectinatus)属、ペクトバクテリウム(Pectobacterium)属、ペジオコッカス(Pediococcus)

s) 属、ペドバクター (Pedobacter) 属、ペドミクロビウム (Pedomicrobium) 属、ペ
トロトガ (Petrotoga) 属、ペニバチルス (Paenibacillus) 属、ベネッケア (Benecke
a) 属、ペプトコッカス (Peptococcus) 属、ペプトストレプトコッカス (Peptostrep
tococcus) 属、ペプトニフィラス (Peptoniphilus) 属、ヘモバルトネラ (Haemobart
onella) 属、ヘモフィルス (Haemophilus) 属、ヘリオスリクス (Heliothrix) 属、ヘ
リオバクテリウム (Heliobacterium) 属、ヘリオバチルス (Heliobacillus) 属、ヘ
リオフィラム (Heliophilum) 属、ヘリオレスティス (Heliorestis) 属、ヘリコバク
ター (Helicobacter) 属、ペリステガ (Pelistega) 属、ペルクザリア (Pelczaria) 属
、ベルゲイエラ (Bergeyella) 属、ヘルココッカス (Helcococcus) 属、ベルコシス
ポラ (Verrucosispora) 属、ベルコミクロビウム (Verrucomicrobium) 属、ベルシコ
バクター (Persicobacter) 属、ヘルバスピリラム (Herbaspirillum) 属、ヘルビド
スポラ (Herbidospora) 属、ヘルペトシフォン (Herpetosiphon) 属、ペロジクチオ
ン (Pelodictyon) 属、ペロスポラ (Pelospora) 属、ペロバクター (Pelobacter) 属、
ボゲセラ (Vogesella) 属、ボゴリエラ (Bogoriella) 属、ボセア (Bosea) 属、ポラリ
バクター (Polaribacter) 属、ポラロモナス (Polaromonas) 属、ホランドイナ (Holl
andina) 属、ポリアンギウム (Polyangium) 属、ポリヌクレオバクター (Polynucleo
bacter) 属、ボルカニエレラ (Volcaniella) 属、ボルデテラ (Bordetella) 属、ホル
デマニア (Holdemania) 属、ポルフィロバクター (Porphyrobacter) 属、ポルフィロ
モナス (Porphyromonas) 属、ボレリア (Borrelia) 属、ホロスポラ (Holospora) 属、
ホロファーガ (Holophaga) 属、ホンギア (Hongia) 属、マイオサーマス (Meiothermu
s) 属、マイコバクテリウム (Mycobacterium) 属、マイコプラズマ (Mycoplasma) 属
、マイコプラナ (Mycoplana) 属、マイセトコラ (Mycetocola) 属、マイロイデス (My
roides) 属、マグネトスピリラム (Magnetospirillum) 属、マクロコッカス (Macro
coccus) 属、マクロモナス (Macromonas) 属、マッシリア (Massilia) 属、マリカウリ
ス (Maricaulis) 属、マリクロマチウム (Marichromatium) 属、マリココッカス (Mar
inococcus) 属、マリニトガ (Marinitoga) 属、マリニラビリア (Marinilabilia) 属
、マリノスピリラム (Marinospirillum) 属、マリノバクター (Marinobacter) 属、
マリノバクテリウム (Marinobacterium) 属、マリノモナス (Marinomonas) 属、マル
モリコラ (Marmoricola) 属、マロノモナス (Malonomonas) 属、マンハイミア (Mannh

eimia)属、ミカビブリオ(Micavibrio)属、ミクソコッカス(Myxococcus)属、ミクロエロスポリア(Microellobosporia)属、ミクロコッカス(Micrococcus)属、ミクロシクルス(Microcyclus)属、ミクロシステイス(Microcystis)属、ミクロシラ(Microscilla)属、ミクロスフェラ(Microsphaera)属、ミクロテトラスポラ(Microtetraspora)属、ミクロバーグラ(Microvirgula)属、ミクロバクテリウム(Microbacterium)属、ミクロバルビファー(Microbulbifer)属、ミクロビスポラ(Microbispora)属、ミクロプリーナ(Micropruina)属、ミクロポリスポラ(Micropolyspora)属、ミクロモナス(Micromonas)属、ミクロモノスポラ(Micromonospora)属、ミクロルナタス(Microlunatus)属、ミツオケラ(Mitsuokella)属、メガスフェラ(Megasphaera)属、メガモナス(Megamonas)属、メソフィロバクター(Mesophilobacter)属、メソプラズマ(Mesoplasma)属、メソリゾビウム(Mesorhizobium)属、メタニミクロコッカス(Methanimicrococcus)属、メタノカルキュラス(Methanocalculus)属、メタノクレウス(Methanoculleus)属、メタノゲニウム(Methanogenium)属、メタノコーパスクルム(Methanocorpusculum)属、メタノココイデス(Methanococcoides)属、メタノコッカス(Methanococcus)属、メタノサーマス(Methanothermus)属、メタノサーモバクター(Methanothermobacter)属、メタノサエタ(Methanosaeta)属、メタノサルチナ(Methanosarcina)属、メタノスピリラム(Methanospirillum)属、メタノスフェラ(Methanosphaera)属、メタノスリクス(Methanothrix)属、メタノバクテリウム(Methanobacterium)属、メタノハロビウム(Methanohalobium)属、メタノハロフィラス(Methanohalophilus)属、メタノピラス(Methanopyrus)属、メタノフォリス(Methanofollis)属、メタノプラヌス(Methanoplanus)属、メタノブレヴィバクター(Methanobrevibacter)属、メタノミクロビウム(Methanomicrobium)属、メタノラシニア(Methanolacinia)属、メタノロバス(Methanolobus)属、メタロスフェラ(Metallosphaera)属、メチルアーキュリア(Methylarcula)属、メチロカルダム(Methylocaldum)属、メチロコッカス(Methylococcus)属、メチロサルチナ(Methylosarcina)属、メチロシステイス(Methylocystis)属、メチロシナス(Methylosinus)属、メチロスフェラ(Methylosphaera)属、メチロセラ(Methylocella)属、メチロバクター(Methylobacter)属、メチロバクテリウム(Methylobacterium)属、メチロバチルス(Methylobacillus)属、メチロピラ(Methylopi

la)属、メチロファーガ(Methylophaga)属、メチロフィラス(Methylophilus)属、メチロボラス(Methylovorus)属、メチロミクロビウム(Methylomicrobium)属、メチロモナス(Methylomonas)属、メチロラブダス(Methylorhabdus)属、メニスカス(Meniscus)属、メリタンギウム(Melittangium)属、メリッソコッカス(Melissococcus)属、モエレレラ(Moellerella)属、モーレラ(Moorella)属、モギバクテリウム(Mogibacterium)属、モデストバクター(Modestobacter)属、モビランカス(Mobiluncus)属、モラキセラ(Moraxella)属、モルガネラ(Morganella)属、モルチエレラ(Mortiella)属、モロコッカス(Morococcus)属、ユーバクテリウム(Eubacterium)属、ヨードバクター(Iodobacter)属、ヨケネラ(Yokenella)属、ラーネラ(Rahnella)属、ラウールテラ(Raoultella)属、ラクトコッカス(Lactococcus)属、ラクトスフェラ(Lactosphaera)属、ラクトバチルス(Lactobacillus)属、ラクノスピラ(Lachnospira)属、ラタイバクター(Rathayibacter)属、ラブドクロマチウム(Rhabdochromatium)属、ラブリス(Labrys)属、ラルストニア(Ralstonia)属、ラロバクター(Rarobacter)属、ランプロシスティス(Lamprocystis)属、ランプロバクター(Lamprobacter)属、ランプロペディア(Lampropedia)属、リエメレラ(Riemerella)属、リケッチア(Rickettsia)属、リケッチエレラ(Rickettsiella)属、リケネラ(Rikenella)属、リステリア(Listeria)属、リストネラ(Listonella)属、リソバクター(Lysobacter)属、リゾバクター(Rhizobacter)属、リゾビウム(Rhizobium)属、リゾモナス(Rhizomonas)属、リチカム(Lyticum)属、リムノバクター(Limnobacter)属、ルイネラ(Lewinella)属、ルエゲリア(Ruegeria)属、ルガモナス(Rugamonas)属、ルシバクテリウム(Lucibacterium)属、ルテイモナス(Luteimonas)属、ルテオコッカス(Luteococcus)属、ルネラ(Runella)属、ルブリビバクス(Rubrivivax)属、ルブリモナス(Rubrimonas)属、ルプロバクター(Rubrobacter)属、ルミノコッカス(Ruminococcus)属、ルミノバクター(Ruminobacter)属、レイフソニア(Leifsonia)属、レクレルシア(Leclercia)属、レケバリエリア(Lechevalieria)属、レジオネラ(Legionella)属、レニバクテリウム(Renibacterium)属、レビネア(Levinea)属、レプトスピラ(Leptospira)属、レプトスポリラム(Leptospirillum)属、レプトスリクス(Leptothrix)属、レプトトリキア(Leptotrichia)属、レプトネマ(Leptonema)属、レミノレラ(Leminorella)属、レンツェア(Lentz

ea)属、ロイコスリクス(*Leucothrix*)属、ロイコノストック(*Leuconostoc*)属、ロイコバクター(*Leucobacter*)属、ローソニア(*Lawsonia*)属、ロートロピア(*Lautropia*)属、ロカリメア(*Rochalimaea*)属、ロセアテレス(*Roseateles*)属、ロセイナトロノバクター(*Roseinatronobacter*)属、ロセイビウム(*Roseibium*)属、ロセイビバクス(*Roseivivax*)属、ロセオコッカス(*Roseococcus*)属、ロセオスピラ(*Roseospira*)属、ロセオスピリラム(*Roseospirillum*)属、ロセオバクター(*Roseobacter*)属、ロセオバリウス(*Roseovarius*)属、ロセオモナス(*Roseomonas*)属、ロセブリア(*Roseburia*)属、ロダノバクター(*Rhodanobacter*)属、ロチア(*Rothia*)属、ロドコッカス(*Rhodococcus*)属、ロドサーマス(*Rhodothermus*)属、ロドシクルス(*Rhodocyclus*)属、ロドシスタ(*Rhodocista*)属、ロドシュードモナス(*Rhodopseudomonas*)属、ロドスピラ(*Rhodospira*)属、ロドスピリラム(*Rhodospirillum*)属、ロドタラシウム(*Rhodothalassium*)属、ロドバカ(*Rhodobaca*)属、ロドバクター(*Rhodobacter*)属、ロドビウム(*Rhodobium*)属、ロドビブリオ(*Rhodovibrio*)属、ロドピラ(*Rhodopila*)属、ロドフェラクス(*Rhodoferax*)属、ロドプラネス(*Rhodoplanes*)属、ロドブラム(*Rhodovulum*)属、ロドミクロビウム(*Rhodomicrobium*)属、ロネピネラ(*Lonepinella*)属、ワイセラ(*Weissella*)属、ワドリア(*Waddlia*)属などに属するものが挙げられる。

【0015】

また、例えば真核微生物に属するイッサチェンキア(*Issatchenkia*)属、カンジダ(*Candida*)属、クリプトコッカス(*Cryptococcus*)属、クリベロマイセス(*Kluyveromyces*)属、クロエッケラ(*Kloeckera*)属、サッカロマイコデス(*Saccharomycodes*)属、サッカロマイセス(*Saccharomyces*)属、ジゴサッカロマイセス(*Zygosaccharomyces*)属、シゾサッカロマイセス(*Schizosaccharomyces*)属、シロバシジウム(*Sirobasidium*)属、ステリグマトマイセス(*Sterigmatomyces*)属、スポリドボラス(*Sporidobolus*)属、スポロボロマイセス(*Sporobolomyces*)属、デッケラ(*Dekkera*)属、デバリオマイセス(*Debaryomyces*)属、トリコスポロン(*Trichosporon*)属、トリゴノプシス(*Trigonopsis*)属、トルラスポラ(*Torulaspora*)属、トレメラ(*Tremella*)属、ナドソニア(*Nadsonia*)属、ネマトスポラ(*Nematospora*)属、ハンセニアスポラ(*Hanseniaspora*)属、ピキア(*Pichia*)属、フィプロバシジウム(*Fibuloba*

sidium)属、フィロバシジウム(Filobasidium)属、フィロバシジエラ(Filobasidella)属、ブレラ(Bullera)属、ブレッタノマイセス(Brettanomyces)属、ホルターマンニア(Holtermannia)属、マラッセジア(Malassezia)属、メチニコイア(Metschnikowia)属、リポマイセス(Lipomyces)属、ロイコスפורジウム(Leucosporidium)属、ロドスפורジウム(Rhodosporidium)属、ロドトルラ(Rhodotorula)属、アカウロペイジ(Acaulopage)属、アクアモルチエレラ(Aquamortierella)属、アセラリア(Asellaria)属、アモエビジウム(Amoebidium)属、アモエボフィルス(Amoebophilus)属、アルンジヌラ(Arundinula)属、ウサロミケス(Utharomyces)属、エキノスポランジウム(Echinosporangium)属、エンテロブリウス(Enterobryus)属、エンドゴネ(Endogone)属、エントモフトラ(Entomophthora)属、キクセラ(Kickxella)属、ゲニステロスポラ(Genistellospora)属、コアネフォラ(Choanephora)属、コエマンシア(Coemansia)属、コクロネマ(Cochlonema)属、コニジオボルス(Conidiobolus)属、サクセナエア(Saksenaea)属、サムニジウム(Thamnidium)属、サムノセファリス(Thamnocephalis)属、ジスピラ(Dispira)属、ジマルガリス(Dimargaris)属、シンセファラストルム(Syncephalastrum)属、シンセファリス(Syncephalis)属、ゾーペイジ(Zoopage)属、スクレロキスチス(Sclerocystis)属、スミチウム(Smittium)属、バシジオボルス(Basidiobolus)属、パラタエニエラ(Parataeniella)属、パラモエビジウム(Paramoebidium)属、パラワスキア(Palavascia)属、ハルペラ(Harpella)属、ピプトセファリス(Piptocephalis)属、ピロボルス(Pilobolus)属、フィコミケス(Phycomyces)属、ブラケスレア(Blakeslea)属、ヘッセルチネラ(Hesseltinella)属、ヘリコケファルム(Helicocephalum)属、ミコチファ(Mycotypha)属、ラジオミケス(Radiomyces)属、レゲリオミケス(Legeriomyces)属、ロパロミケス(Rhopalomyces)属、アクラシス(Acrasis)属、アシトステリウム(Acytostelium)属、アルシリア(Arcyria)属、エキノステリウム(Echinostelium)属、エキノステリオプシス(Echinosteliopsis)属、オリゴネマ(Oligonema)属、カボステリウム(Cavostelium)属、グツリノプシス(Guttulinopsis)属、クラストデルマ(Clastoderma)属、クリブラリア(Cribraria)属、コエノニア(Coenonia)属、コプロミクサ(Copromyxa)属、コマトリカ(Comatricha)属、コロデルマ(Colloderma)属、ジアネマ(Dianema)属、ジクチオステリウム(Dictyost

elium)属、ジジミウム (Didymium)属、ジデルマ (Diderma)属、ステモニチス (Stemonitis)属、スラウストキトリウム (Thraustochytrium)属、セラチオミクサ (Ceratiomyxa)属、セラチオミクセラ (Ceratiomyxella)属、トリキア (Trichia)属、フィサルム (Physarum)属、プラスモジオフォラ (Plasmodiophora)属、フリゴ (Fuligo)属、ブルスラ (Bursulla)属、プロトステリウム (Protostelium)属、プロトスポランジウム (Protosporangium)属、ヘミトリキア (Hemitrichia)属、ペリカエナ (Perichaena)属、ポリスフォンジリウム (Polysphondylium)属、ポリミクサ (Polymyxa)属、ラビリンツラ (Labyrinthula)属、ランプロデルマ (Lamproderma)属、リコガラ (Lycogala)属、リセア (Licea)属、ワードミケス (Wardmyces)属、アクチノペルテ (Actinopelte)属、アステロスポリウム (Astero sporium)属、アルスリニウム (Arthrinium)属、アルタナリア (Alternaria)属、オイジウム (Oidium)属、クラボスポリウム (Clabosporium)属、クラドボトリウム (Cladobotryum)属、グラフィウム (Graphium)属、コレトトリクム (Colletotrichum)属、スクレロチウム (Sclerotium)属、スタゴノスポラ (Stagonospora)属、スチベラ (Stibella)属、ツベルクラリア (Tubercularia)属、バクトリジウム (Bactridium)属、ピクノスリウム (Pycnothyrium)属、ファエオイサリア (Phaeoisaria)属、ペスタロッチエラ (Pestalozziella)属、リゾクトニア (Rhizoctonia)属、リノクラジエラ (Rhinocladiella)属、レプトスリウム (Leptothyrium)属、アクリオゲトン (Achlyogeton)属、アニソルピジウム (Anisolpidium)属、アルブゴ (Albugo)属、エクトロゲラ (Ectrogella)属、オリピジウム (Olipidium)属、オルピジオプシス (Olpidiopsis)属、カテナリア (Catenaria)属、キトリジウム (Chytridium)属、クラドキトリウム (Cladochytrium)属、コエロモミケス (Coelomomyces)属、ゴナポジア (Gonapodya)属、サブロレグニア (Saprolegnia)属、シロルピジウム (Sirolpidium)属、シンキトリウム (Synchytrium)属、ハリフトロス (Haliphthoros)属、ハルポキトリウム (Harpochytrium)属、ピチウム (Pythium)属、ヒフォキトリウム (Hyphochytrium)属、フィソデルマ (Physoderma)属、フィリクチジウム (Phlyctidium)属、ブラストクラジア (Blas tocladia)属、ペロノスポラ (Peronospora)属、ペロノフィトラ (Peronophythora)属、ミクロミコプシス (Micromycopsis)属、メガキトリウム (Megachytrium)属、モノブレファリス (Monoblepharis)属、ラゲニジウム (Lagenidium)属、リジジオ

ミケス(Rhizidiomyces)属、リソジウム(Rhizidium)属、リビジウム(Rhipidium)属、レプトミタス(Leptomitus)属、レプトレグニエラ(Leptolegniella)属、アクレモニウム(Acremonium)属、アスペルギルス(Aspergillus)属、アブシジア(Absidia)属、アラクニオタス(Arachniotus)属、アルスロボトリス(Arthrobotrys)属、ウロクラジウム(Ulocladium)属、エキノボトリウム(Echinobotryum)属、エクソフィアラ(Exophiala)属、エピコックム(Epicoccum)属、オイジオデンドロン(Oidiodendron)属、オエドセファラム(Oedocephalum)属、オーレオバシジウム(Aureobasidium)属、クルブラリア(Curvularia)属、カンデラブレラ(Candelabrella)属、カンニングハメラ(Cunninghamella)属、ギムノアスカス(Gymnoascus)属、クラドスポリウム(Cladosporium)属、グラフィウム(Graphium)属、グリオクラジウム(Gliocladium)属、クリソスポリウム(Chrysosporium)属、クロメロスポリウム(Chromelosporium)属、ゲオトリクム(Geotrichum)属、ゲオミケス(Geomyces)属、ケトミウム(Chaetomium)属、ゲニクリフェラ(Geniculifera)属、ゴナトボトリス(Gonatobotrys)属、コニオチリウム(Coniothyrium)属、サーシネラ(Circinella)属、ジゴリンクス(Zygorhynchus)属、ジプロジア(Diplodia)属、シリンドロカーボン(Cylindrocarpon)属、スコプラリオプシス(Scopulariopsis)属、スタチボトリス(Stachybotrys)属、ステンフィリウム(Stemphylium)属、スポロスリックス(Sporothrix)属、セペドニウム(Sepedonium)属、ダクチレラ(Dactylella)属、タラロミケス(Talaromyces)属、ドラトミケス(Dratomyces)属、トリクルス(Trichurus)属、トリコクラジウム(Trichocladium)属、トリコセシウム(Trichothecium)属、トリコデルマ(Trichoderma)属、トリコフィトン(Trichophyton)属、ニグロスポラ(Nigrospora)属、バーチシクラジエラ(Verticicladiella)属、バーチシリウム(Verticillium)属、パエシロミケス(Paecilomyces)属、ピトミケス(Pithomyces)属、ビポラリス(Bipolaris)属、ピレノキエタ(Pyrenochaeta)属、フィアロセファラ(Phialocephala)属、フィアロフォラ(Phialophora)属、フォーマ(Phoma)属、フザリウム(Fusarium)属、ペスタロチオプシス(Pestalotiopsis)属、ペニシリウム(Penicillium)属、ボトリチス(Botrytis)属、ミクロスポルム(Microsporium)属、ミロセシウム(Myrothecium)属、ムコール(Mucor)属、メモノニエラ(Memnoniella)属、モナクロスポリウム(Monacrosporium)属、モニリア(Monilia)属

、モルチエレラ (Mortierella) 属、ユーベニシリウム (Eupenicillium) 属、ユーロチウム (Eurotium) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、レプトグラフィウム (Leptographium) 属、ロビラーダ (Robillarda) 属、アウストロボレトウス (Austroboletus) 属、アウリクラリア (Auricularia) 属、アウリスカルピウム (Auriscalpium) 属、アガリクス (Agaricus) 属、アグロキベ (Agrocybe) 属、アステロフォナ (Asterophona) 属、アストラエウス (Astraeus) 属、アセロエ (Aseroe) 属、アネルラリア (Anellaria) 属、アマウロデルマ (Amauroderma) 属、アマニタ (Amanita) 属、アルミルラリア (Armillaria) 属、アルミルラリエルラ (Armillariella) 属、アレウリア (Aleuria) 属、イスクノデルマ (Ischnoderma) 属、イノキベ (Inocybe) 属、イノノトウス (Inonotus) 属、イレオディクティオン (Ileodictyon) 属、ウィンネア (Wynnea) 属、ヴェルバ (Verpa) 属、ヴォルヴァリエルラ (Volvariella) 属、ウルヌラ (Urnula) 属、エキノドンティウム (Echinodontium) 属、エクシディア (Exidia) 属、エルフヴァインギア (Elfvigia) 属、オウデマンシエルラ (Oudemansiella) 属、オムファリナ (Omphalina) 属、オンニア (Onnia) 属、カタテラスマ (Catathelasma) 属、ガノデルマ (Ganoderma) 属、カマロフィルス (Camarophyllus) 属、カルキポルス (Chalciporus) 属、ガレリナ (Galerina) 属、カロケラ (Calocera) 属、カロストマ (Calostoma) 属、カンタレルス (Cantharellus) 属、カンタレルラ (Cantharellula) 属、キアトウス (Cyathus) 属、キクロミケス (Cyclomyces) 属、キストデルマ (Cystoderma) 属、キプトトラマ (Cyptotrama) 属、キマトデルマ (Cymatoderma) 属、ギムノピルス (Gymnopilus) 属、キューネロミケス (Kuehneromyces) 属、ギロドン (Gyrodon) 属、ギロポルス (Gyroporus) 属、ギロミトラ (Gyromitra) 属、グエピニア (Guepinia) 属、クサントコニウム (Xanthoconium) 属、クシラリア (Xylaria) 属、クセロコムス (Xerocomus) 属、クセロンファリナ (Xeromphalina) 属、クドニア (Cudonia) 属、クラヴァティア (Clavatia) 属、クラヴァリア (Clavaria) 属、クラヴァリアデルフス (Clavariadelphus) 属、クラヴィコロナ (Clavicornia) 属、クラヴウリナ (Clavulina) 属、クラヴウリノプシス (Clavulinopsis) 属、クラテレルス (Craterellus) 属、クラトルス (Clathrus) 属、クリトキベ (Clitocybe) 属、クリトピルス (Clitopilus) 属、クリニベルリス (Crinipellis) 属、グリフォラ (Grifola) 属、クリプトデルマ (Cryptoderma) 属、クリプトポルス (Cryptoporus) 属、クルキブルム (Crucibu

lum)属、クレオロフス(Creolophus)属、クレピドトウス(Crepidotus)属、クロオ
ゴムフス(Chroogomphus)属、クロロスプレニウム(Chlorosplenium)属、ゲアスト
ルム(Geastrum)属、ゲオロッスム(Geolossium)属、コティリディア(Cotylidia)属
、コノキベ(Conocybe)属、コバヤシア(Kobayasia)属、コプリヌス(Coprinus)属
、ゴムフィディウス(Gomphidius)属、ゴムフス(Gomphus)属、コリオルス(Coriol
us)属、コルディケプス(Cordyceps)属、コルティナリウス(Cortinariius)属、コ
ルトリキア(Coltricia)属、コルリビア(Collybia)属、サルコスキファ(Sarcoscy
pha)属、サルコドン(Sarcodon)属、サルコドンティア(Sarcodontia)属、スイル
ス(Suillus)属、スキゾフィラム(Schizophyllum)属、スクアマニタ(Squamanita)
属、スクテルリニア(Scutellinia)属、スクレロデルマ(Scleroderma)属、ステレ
ウム(Stereum)属、ストロビロミケス(Strobilomyces)属、ストロファリア(Strop
haria)属、スパトゥラリア(Spathularia)属、スパラッシス(Sparassis)属、ダエ
ダレオプシス(Daedaleopsis)属、ダクリオミケス(Dacryomyces)属、ダルディニ
ア(Daldinia)属、ディクティオフォラ(Dictyophora)属、ティロピルス(Tylopilu
s)属、ティロミケス(Tyromyces)属、デスコレア(Descolea)属、テレフォラ(The
lephora)属、トゥロストマ(Tulostoma)属、トラメテス(Trametes)属、トリコグロ
ッスム(Trichoglossum)属、トリココマ(Trichocoma)属、トリコロマ(Tricoloma)
属、トリコロモプシス(Tricholomopsis)属、トレメルラ(Tremella)属、トレメル
ロドン(Tremellodon)属、ナエマトロマ(Naematoloma)属、ニドゥラ(Nidula)属、
ネオブルガリア(Neobulgaria)属、バエオスポラ(Baeospora)属、パクスイルス(Pax
illus)属、バッタレア(Battarea)属、パナエオルス(Panaeolus)属、パヌス(Panu
s)属、パネルス(Panellus)属、バンケラ(Bankera)属、ヒグロキベ(Hygrocybe)属
、ヒグロフォルス(Hygrophorus)属、ヒグロフォロプシス(Hygrophoropsis)属、
ビスポレルラ(Bisporella)属、ピソリトゥス(Pisolithus)属、ヒドヌム(Hydnum)
属、ヒドネルム(Hydnellum)属、ヒプシジグス(Hypsizygus)属、ピプトポルス(Pi
ptoporus)属、ヒポキシロン(Hypoxyton)属、ヒメノカエテ(Hymenochaete)属、ヒ
ルシオポルス(Hirschioporus)属、ピルロデルマ(Pyrrhoderma)属、ファヴォルス
(Favolus)属、ファエオルス(Phaeolus)属、ファエオレピオタ(Phaeolepiota)属
、ファルス(Phallus)属、フィストウリナ(Fistulina)属、フィルロトプシス(Phy

llotopsis)属、フィルロポルス(Phylloporus)属、フィロボレトウス(Filoboletus)属、フェルリヌス(Phellinus)属、フォミトプシス(Fomitopsis)属、フォメス(Fomes)属、フォリオタ(Pholiota)属、プサティレルラ(Psathyrella)属、プシロキベ(Psilocybe)属、プセウドコルス(Pseudocolus)属、プセウドヒアトゥラ(Pseudohiatula)属、プテルラ(Pterula)属、フランムリナ(Flammulina)属、プルヴェロボレトウス(Pulveroboletus)属、ブルガリア(Bulgaria)属、プルテウス(Pluteus)属、プレウロキベルラ(Pleurocybella)属、プレウロトウス(Pleurotus)属、プレクタニア(Plectania)属、フロギオティス(Phlogiotis)属、ペジザ(Peziza)属、ペニキルリオプシス(Penicilliopsis)属、ヘベロマ(Hebeloma)属、ヘリキウム(Hericium)属、ヘルヴェルラ(Helvella)属、ポドストロマ(Podostroma)属、ポリオゼルス(Polyozellus)属、ポリポルス(Polyporus)属、ポリポレルス(Polyporellus)属、ホルターマンニア(Holtermannia)属、ボルビティウス(Bolbitius)属、ポルフィレルス(Porphyrellus)属、ボレティヌス(Boletinus)属、ボレテルス(Boletellus)属、ボレトウス(Boletus)属、ボレトプシス(Boletopsis)属、ポロディスクルス(Porodisculus)属、ボンダルゼウイア(Bondarzewia)属、マクロキスティディア(Macrocyttidia)属、マクロポディア(Macropodia)属、マクロレピオタ(Macrolepiota)属、マラスミウス(Marasmius)属、マラスミエルス(Marasmiellus)属、ミクロポルス(Microporus)属、ミケナ(Mycena)属、ミトルラ(Mitrula)属、ムティヌス(Mutinus)属、メラノレウカ(Melanoleuca)属、メルリウス(Merulius)属、モルケラ(Morchella)属、ラエティポルス(Laetiporus)属、ラクタリウス(Lactarius)属、ラシオスファエラ(Lasiosphaera)属、ラッカリア(Laccaria)属、ラマリア(Ramaria)属、ランプテロミケス(Lampteromyces)属、リオフィルム(Lyophyllum)属、リギドポルス(Rigidoporus)属、リコペルドン(Lycoperdon)属、リジナ(Rhizina)属、リスルス(Lysurus)属、リマケルラ(Limacella)属、リンデラ(Lindera)属、ルッスラ(Russula)属、レウココプリヌス(Leucocoprinus)属、レウコパクスシルス(Leucopaxillus)属、レオティア(Leotia)属、レスピナトウス(Respinatus)属、レッキヌム(Leccinum)属、レピオタ(Lepiota)属、レピスタ(Lepista)属、レンジテス(Lenzites)属、レントタリア(Lentaria)属、レンティヌス(Lentinus)属、レンティヌラ(Lentinula)属、レンティネルス(Lentinellus)属、ロジテ

ス(Rozites)属、ロドキベ(Rhodocybe)属、ロドトゥス(Rhodotus)属、ロドフィルス(Rhodophyllus)属などに属するものが挙げられる。

【0016】

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産能を有する上記微生物は、受託番号で I F O や A T C C などに寄託されており、公知の分譲機関、法人より入手可能である。好ましくは真核微生物、より好ましくは糸状菌に属する微生物が挙げられる。また、「97508」として命名され、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、F E R M P-19103として寄託された微生物を使用してもよい。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法としての一態様は、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の生産能を有する微生物を栄養培地にて培養し、培養液中に補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生成蓄積せしめこれを採取し、補酵素結合型グルコース脱水素酵素であるタンパク質およびその塩を取得することが挙げられる。

【0017】

本発明の寄託菌株 F E R M P-19103 に由来する補酵素結合型グルコース脱水素酵素の理化学的性質について説明する。

(1)作用：電子受容体存在下でグルコースの1位の水酸基を酸化してグルコノ- δ -ラク톤を生成する反応を触媒する酵素で、国際生化学連合(IUB)の分類では酵素番号1.1.99.10に分類される。

本発明で使用される電子受容体としてはフェナジンメトサルフェート、1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェイト、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、フェリシアン化合物などが挙げられ利用できる。

【0018】

【化1】

グルコース+電子受容体→グルコノ- δ -ラク톤+還元型電子受容体

【0019】

(2)基質特異性：下記する活性測定方法1でD-グルコースおよび他の各基質(いずれも終濃度333mM、D-セロビオースは193mM、D-トレハロースおよびD-ラフィノースは121mM)を使用した場合の相対反応性(基質特異性)は、表1の様であった。また、終濃度550mM、100mMのD-グルコースおよびマルトースを使用した場合の相対反応性(基質特異性)は、表2の様であった。D-グルコースには強く作用し、D-マンノース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトール、D-セロビオース、D-トレハロース、マルトース、D-ガラクトース、D-グルコース-6-リン酸、D-フルクトースには弱く作用した。また、L-アラビノース、ラクトース、D-ソルビトール、グルコン酸、スクロース、D-マンニトール、L-ソルボース、D-リボース、L-ラムノース、D-グルコース-1-リン酸、D-ラフィノース、エタノール、グリセロールにはほとんど作用しなかった。

【0020】

(3)至適pH：pH7.0～9.0

(4)安定pH：pH4.5～8.5

(5)至適温度：55℃付近

(6)温度安定性：50℃まで

【0021】

(7)分子量：補酵素結合型グルコース脱水素酵素の分子量は、ゲル濾過法で測定した結果、約130kDaであった。また、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定値は、約85kDaであった。

(8)Km値：49.7mM D-グルコース

(9)等電点：等電点電気泳動法で測定した補酵素結合型グルコース脱水素酵素の等電点(pI)は、約4.4であった。

(10)阻害剤：下記する活性測定方法1に、終濃度1mMの各添加物を添加し、活性を測定したところ、対照区に対し、各添加物により表3の様な阻害効果が認められた。また、下記する活性測定法1に、各終濃度の1,10-フェナントロリン(メタノールに溶解)を添加したところ表4の様な阻害効果が認められた。本酵素は、重金属イオン(Ag⁺、Cu²⁺、Hg²⁺)で強く阻害され、1,10-フェナントロリン、プロフラビン、Mn²⁺で60%以上阻害された。

(11)補酵素：フラビンアデニンジヌクレオチド

【0022】

補酵素結合型グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子の塩基配列に関しても本発明に属する。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造に際し、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素製造に使用される微生物は、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生産可能な生物であればよく、例えば、微生物、好ましくは真核微生物、より好ましくは糸状菌に属する微生物を使用して効率的に製造することができる。特には、「97508」と命名され、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、FERM P-19103として寄託された微生物を使用してもよい。該寄託菌株は、本発明者らによって土壤中より分離され、その菌学的性質は、下記の通りである。なお、本発明においては、前記菌株の変異株も使用できる。変異株は、紫外線、エックス線などの放射線または化学的変異剤(NTGなど)などの処理によって得られる。

【0023】

(寄託菌株97508株の菌学的性質)

(1)形態的性質：ポテト・デキストロース寒天培地上で生育した本菌株の光学顕微鏡下での形態的特徴を以下に記述する。菌糸は幅2～4 μ m、規則的な隔壁を有する。菌糸の大半は直線的な生育で、膨化した菌糸はほとんどみられず、分枝を有する。数本の菌糸がより集まり、菌糸束を形成する。菌糸幅はほぼ一定。菌糸の表面は平滑で、壁はやや厚い。気中菌糸基部を中心に結晶体の形成がある。かすがい連結の形成はみられない。培養2週間後までの菌体からは有性・無性生殖器官の形成はみられず、分裂子および厚壁胞子の存在もみられない。

【0024】

(2)各培地での生育状態：全ての寒天培地上において菌糸は綿毛状。気中菌糸色調は白色を呈する。ポテト・デキストロース寒天培地培養では淡橙色～橙色の裏面着色を呈する。生育は中程度で、25℃1週間培養後のコロニーはポテト・デキストロースおよびオートミール寒天培地で直径30～35mm、麦芽エキスを寒天培地では直径37～38mm。また、ポテト・デキストロース寒天培地培養で

淡黄色、オートミール寒天培地で薄赤色～灰赤色の可溶性色素の産生がみられた。培養2週間後までの菌体からは分生子柄などの生殖器官の形成はみられず、滲出液の産生もみられなかった。

【0025】

(3)生理的性質：本菌株は、好気性で、ポテト・デキストロース寒天培地において生育至適温度は37℃付近である。

【0026】

以上の性質に基づき寄託菌株である「97508」を、ホークスワース、サットン、エーンズワース編、エーンズワース・アンド・ビスビーズ・ディクショナリー・オブ・ザ・ファンジャイ第7版に従って検索を行った。この検索から該寄託株は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する微生物であることが示された。さらに、BLAST相同性検索を行った。ゲノムDNAをテンプレートとして、PCR法により18S rDNAフラグメントの増幅を行った後、精製したPCR産物の配列を解読した。類似の塩基配列をGenBank (GenBank/EMBL/DDBJ 国際DNA配列データベース) から検索するため、BLAST (Altschul et al., 1997) による相同性検索を行った結果、該寄託株「97508」は、アスペルギルス テレウス (*Aspergillus terreus*) であることが判明した。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法の一態様として、上記の微生物を培養し、微生物菌体内および/または菌体外に該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を発現、もしくは生産させ得る方法が挙げられる。

本発明で使用される微生物の培養には、通常の微生物培養用培地が使用でき、炭素源、窒素源、無機物その他使用微生物が必要とする微量栄養素を程よく含有するものであれば、合成培地、天然培地の何れでも使用可能である。炭素源としては、グルコース、シュクロース、デキストリン、澱粉、グリセリン、糖蜜などが使用できる。窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの無機塩類、DL-アラニン、L-グルタミン酸などのアミノ酸類、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、コーンステイープリカーなどの窒素含有天然物が使用できる。無機物としては、リン酸

一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第二鉄などが使用できる。

【0027】

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得るための培養は、通常、振盪培養や通気攪拌などの方法による好氣的条件下で行うのがよく、25～60℃、pH 5～8で行うのが好ましい。培養期間は、2～4日間で行うのが好ましい。この様な方法で培養することにより、培養物中、特に培養液中に補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生成蓄積することが出来る。また、本培養方法により、培養微生物内にも補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生成蓄積することができる。ついで、培養物中から補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得る方法は、通常の蛋白質の精製方法が使用できる。即ち、微生物を培養後、遠心分離などにより微生物を除き、培養上清を得る。また、微生物を培養後、培養液を遠心分離して培養微生物を得、適当な方法で該培養微生物を破碎し、破碎液から遠心分離などによって上清液を得る。これらの上清液中に含まれる補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、塩析、溶媒沈殿、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などの適当な精製操作を組み合わせることによって精製できる。

【0028】

また、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得るための培養は、固体培地も使用できる。培養方法には特に制限はなく、静置培養によってもよく、培養物を常時混合するような回転培養や流動層培養などによっても行うことができるが、設備投資の少ない培養装置としては静置培養が好ましい。ついで、培養物中から補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得る方法は、通常の蛋白質の精製方法が使用できる。即ち、培養物に水などの抽出剤を加えて攪拌したのち、ふすまなどの培地固形分を遠心分離、濾過などの分離法により除去して抽出液を得ることにより行うことができる。また、菌体内に蓄積された補酵素結合型グルコース脱水素酵素の回収は、上記の抽出液を得た培養物残渣を海砂などの研磨剤とともに磨砕したのち、水などを加えて、菌体から遊離された補酵素結合型グルコース脱水素酵素を抽出する方法などで行うことができる。また、全補酵素結合型グル

コース脱水素酵素を得るには、培養物全体を海砂などの研磨剤とともに磨砕したのち、水などを加えて、菌体から遊離された補酵素結合型グルコース脱水素酵素と培地中に分泌された補酵素結合型グルコース脱水素酵素の両方を一挙に抽出する方法などで行うことができる。これらの上清液中に含まれる補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、塩析、溶媒沈殿、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動などの適当な精製操作を組み合わせることによって精製できる。

【0029】

また、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、合成による補酵素結合型グルコース脱水素酵素や遺伝子工学によって得られた組換え型補酵素結合型グルコース脱水素酵素であってもよい。当業者は本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の理化学的性質に由来するタンパク質およびその塩の開示に基づいて容易に補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得ることができる。例えば、補酵素結合型グルコース脱水素酵素については、糸状菌を含む微生物や動植物などの天然物から抽出するほか、そのアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子の塩基配列をもとに合成法によって得ることができるし、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素遺伝子の遺伝子断片を市販の発現ベクターなど公知の発現ベクターに挿入し、得られたプラスミドを使用して大腸菌などの宿主を形質転換し、形質転換体を培養して目的の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を得るといった遺伝子工学によって該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を工業的に製造することも可能である。

【0030】

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の酵素活性は、次の方法で測定できる。

(酵素活性測定法-1)

0.1 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0) 1 ml、1.0 M D-グルコース 1.0 ml、3 mM 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(以下DCIPという) 0.1 ml、3 mM 1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェイト 0.2 ml、水 0.65 ml を 3 ml 石英セルに添加し、恒温セルホルダー付き

分光光度計にセットして37℃で5分間インキュベート後、酵素溶液0.05 mlを添加後、DCIPの600 nmにおける吸光度変化($\Delta \text{ABS}/\text{min}$)を測定する。DCIPのpH 7.0におけるモル吸光係数を16.3 mM⁻¹とし、1分間に1 μmol のDCIPが還元される酵素量を1単位(unit)として、酵素活性を次式に従って求めた。

【0031】

【数1】

$$\text{酵素活性(units/ml)} = \frac{-\Delta \text{ABS } 600/\text{min}}{16.3} \times \frac{3.0}{0.05} \times \text{酵素の希釈率}$$

【0032】

(酵素活性測定法-2)

1.0 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0) 3.4 μl 、1.0 M D-グルコース 0.1 ml、20 mM DCIP 86.6 μl を37℃で5分間インキュベート後、酵素溶液0.01 mlを添加して攪拌し、5分間反応後100℃で3分間インキュベートし反応を停止した。さらに100 mM グリシン・ナトリウム緩衝液(pH 13.0) 0.19 ml、2.0 N 水酸化カリウム 0.01 mlを添加し37℃で10分間インキュベートし、溶液中のD-グルコン酸をD-グルコノ- δ -ラクトンに変換した後、100 mM トリス・塩酸緩衝液(pH 7.5) 0.39 ml、1.0 N 塩酸 0.01 mlを添加し、pHを中性にした。溶液中のD-グルコン酸をD-グルコン酸/D-グルコノ- δ -ラクトン定量キット(ベーリンガー・マンハイム社製)により定量した。1分間に1 μmol のD-グルコノ- δ -ラクトンを生成する酵素量を1単位(unit)とした。

【0033】

本発明は、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した物質生産および分析用途の提供に関し、医薬用または食品素材の改質加工への使用に関する。一例として、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を試料として生体物質を含む該試料中のグルコースの消去方法、測定方法およびそれらの試薬、試薬組成物に使用する。また、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した有機化合物の製造方法および製造原料に使用する。

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒する酵素である。本発明では、前記反応に本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用する。補酵素結合型グルコース脱水素酵素としては、限定されるわけではないが、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を生産する真核微生物に由来する補酵素結合型グルコース脱水素酵素が好ましく、特に、糸状菌に由来する補酵素結合型グルコース脱水素酵素が好ましい。

【0034】

次に、本発明によって得られた補酵素結合型グルコース脱水素酵素の用途について説明する。補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、電子受容体存在下で、グルコースを酸化する反応を触媒する酵素であるから、この反応による変化が利用できる用途であれば、特に制限されない。例えば、補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、生体物質を含む該試料中のグルコースの測定用試薬、消去用試薬へ使用することが可能である。また、医療分野、臨床分野への使用が可能であり、補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した物質生産および分析の用途において使用が可能となる。

本発明のバイオセンサは、酵素として本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を含む反応層に使用したセンサであればよく、例えば、該バイオセンサは、絶縁性基板上にスクリーン印刷などの方法を利用して作用極、その対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体とを含む酵素反応層を形成することによって作製される。このバイオセンサの酵素反応層上に基質を含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して酵素と基質が反応し、これにともなって電子受容体が還元される。酵素反応終了後、還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。また、この他に、発色強度或いはpH変化などを検知する方式のバイオセンサも構築可能である。これらのバイオセンサにより、測定対象物質を基質とする酵素を選択することによって、様々な物質の測定が可能である。例えば、酵素に本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を選択すると、試料液中のグルコース濃度を測定するグルコースセンサを作製することができる。

【0035】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の実施例によって限定されるものではない。以下の実施例における補酵素結合型グルコース脱水素酵素の活性定量は前記に示した方法に従って行った。

【0036】

実施例1. 寄託菌株97508株の培養

グルコース(和光純薬工業社製)1%、脱脂大豆(日本食販社製)2%、コーンステープリカー(共同商事社製)0.5%、および硫酸マグネシウム(ナカライテスク社製)0.1%より成る培地(pH6.0)100mlを500ml容の培養フラスコに入れ、121℃で20分間殺菌冷却後、培養フラスコに寄託菌株97508株を一白金耳接種し、30℃で88時間振盪培養して、種培養液とした。前記と同様の組成からなる培地に消泡剤を添加した培地4Lを5L容のジャーファーマンターに入れ、121℃で30分間殺菌冷却後、ジャーファーマンターに前記の種培養液を40ml接種し、28℃で31時間、通気攪拌の条件で培養して、前培養液とした。ついで、前記と同様の組成からなる培地に消泡剤を添加した培地160Lを200L容量のジャーファーマンターに入れ、121℃で20分間殺菌して冷却したのち、前記の前培養液1.6Lを接種し、28℃で41時間、通気攪拌の条件で培養した。培養終了後、遠心分離機での遠心分離により培養上清を回収した。

【0037】

実施例2. 培養上清からの補酵素結合型グルコース脱水素酵素の単離

以下のステップ1～5により補酵素結合型グルコース脱水素酵素を単離した。

1. 濃縮:

前記培養で得られた培養上清160Lを限外濾過膜「ペリコン2モジュール」(ミリポア社製)で濃縮し、20mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)に置換し、粗酵素液を得た。

2. Butyl-TOYOPEARL650M(東ソー社製)による精製(第

一回) :

前記粗酵素液を、65% 飽和硫酸アンモニウム液(pH 7.5)になるように調整後、遠心分離し得られた上清を、65% 硫酸アンモニウムを含む20mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)で平衡化したButyl-TOYOPEARL 650Mカラム(直径4.7cm×高さ7.7cm)に通液して酵素を吸着させ、同緩衝液で洗浄したのち、30% 硫酸アンモニウムを含む20mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)で酵素を溶出させて活性画分を集めた。さらに、同緩衝液から20mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)へのグラジエント溶出法で酵素を溶出させて前記活性画分とあわせた。

3. DEAE-セルロファインA-500(生化学工業社製)による精製:

前記活性画分を限外濾過膜「ペリコン2モジュール」で濃縮し、脱塩後15mM トリス・塩酸緩衝液(pH 8.5)と平衡化させ、前記緩衝液で平衡化したDEAE-セルロファインA-500カラム(直径4.7cm×高さ5.2cm)に通液し、溶出液を集めた。

【0038】

4. Butyl-TOYOPEARL 650M(東ソー社製)による精製(第二回) :

前記溶出液を、65% 飽和硫酸アンモニウム液(pH 7.5)になるように調整後、遠心分離し得られた上清を、65% 硫酸アンモニウムを含む20mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)で平衡化したButyl-TOYOPEARL 650Mカラム(直径4.7cm×高さ3.6cm)に通液して酵素を吸着させ、同緩衝液で洗浄したのち、30% 硫酸アンモニウムを含む20mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)で酵素を溶出させて活性画分を集めた。

5. TSK gel G3000SW(東ソー社製)による精製:

前記活性画分をペンシル型膜濃縮モジュール「ACP-0013」(旭化成工業社製)で濃縮し、脱塩後0.2M 塩化ナトリウムを含む50mM リン酸カリウム緩衝液(pH 5.5)と平衡化させ、前記緩衝液で別途平衡化したTSK gel G3000SW(直径2.15cm×高さ60cm)に通液し、同緩衝液で酵素を溶出させ活性画分を分取した。活性画分をセントリプラス10(アミコ

ン社製)で濃縮し、脱塩後 50 mM クエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)に置換した。得られた酵素は、比活性約 1,100 unit/mg であり、その精製度は粗酵素液を 1 とすると約 170 倍であった。

【0039】

実施例 3. 補酵素結合型グルコース脱水素酵素の性質試験

上記の実施例 2 によって単離した補酵素結合型グルコース脱水素酵素について、作用性、至適 pH、安定 pH、至適温度、温度安定性、基質特異性、分子量、阻害剤および補酵素を調べた。

1. 作用性:

補酵素結合型グルコース脱水素酵素を、8.66 mM DCIP 存在下で 500 mM D-グルコースと反応させ、反応産物を D-グルコン酸/D-グルコノ- δ -ラクトン定量キットで定量したところ、D-グルコン酸の生成が確認され、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は D-グルコースの 1 位の水酸基を酸化する反応を触媒する酵素であることが明らかになった。

2. 至適 pH:

上記の酵素活性測定法-2 の緩衝液を、クエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0~5.5)、リン酸カリウム緩衝液(pH 6.5~7.5)、トリス・塩酸緩衝液(pH 8.0~9.0)、グリシン・水酸化ナトリウム緩衝液(pH 9.5~10.0)(各緩衝液とも終濃度で 17 mM)に代え、精製酵素の酵素活性を測定した。結果は図 1 に示した。

その結果、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の至適 pH は、7.0~9.0 であった。

【0040】

3. 安定 pH:

補酵素結合型グルコース脱水素酵素を、50 mM 濃度の緩衝液、すなわちクエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液(pH 3.2~6.4)、リン酸カリウム緩衝液(pH 6.3~7.4)、トリス・塩酸緩衝液(pH 7.3~8.6)、グリシン・水酸化ナトリウム緩衝液(pH 9.1~11.4)の各々に溶解し、40℃で 60 分間保持した後の残存酵素活性率を上記の活性測定方法-1 により測定した。結果は図 2

に示した。

その結果、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の安定 pH は、4.5～8.5 であった。

4. 至適温度:

補酵素結合型グルコース脱水素酵素を 50 mM クエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) に溶解し、上記の活性測定方法-1 により 30℃～62℃までの範囲で酵素活性を測定した。結果は図 3 に示した。

その結果、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の至適温度は、55℃付近であった。

【0041】

5. 温度安定性:

補酵素結合型グルコース脱水素酵素を 50 mM クエン酸・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) に溶解し、0℃～55℃までの各温度で 15 分間保持したのち、残存酵素活性率を前記の活性測定方法 1 により測定した。ここで、残存酵素活性率は、0℃で 15 分間保持した時の酵素活性値を 100% として算出した。結果は図 4 に示した。

その結果、補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、50℃においても 89% の酵素活性が保持され、約 50℃以下で安定であった。

【0042】

6. 基質特異性および Km 値:

上記の活性測定方法-1 における活性測定用反応液の基質を、D-グルコースおよび他の各基質 (いずれも終濃度 333 mM、D-セロビオースは 193 mM、D-トレハロースおよび D-ラフィノースは 121 mM) を使用した場合の相対反応性 (酵素活性) を測定した。結果は D-グルコースの値を基準に相対値として表 1 に示した。

また、終濃度 550 mM、100 mM の D-グルコースおよびマルトースを使用した場合の相対反応性 (酵素活性) を測定した。結果は D-グルコースの値を基準に相対値として表 2 に示した。

その結果、補酵素結合型グルコース脱水素酵素は、D-グルコースには強く作

用し、D-マンノース、1,5-アンヒドロ-D-グルシトール、D-セロビオース、D-トレハロース、マルトース、D-ガラクトース、D-グルコース-6-リン酸、D-フルクトースには弱く作用した。また、L-アラビノース、ラクトース、D-ソルビトール、グルコン酸、スクロース、D-マンニトール、L-ソルボース、D-リボース、L-ラムノース、D-グルコース-1-リン酸、D-ラフィノース、エタノール、グリセロールにはほとんど作用しなかった。Km値は、D-グルコースに対し、49.7mMであった。

【0043】

【表1】

基質	相対活性 (%)
D-グルコース	100
2-デオキシ-D-グルコース	48
D-キシロース	9.1
D-マンノース	2.8
1,5-アンヒドロ-D-グルシトール	2
D-セロビオース	2
D-トレハロース	1.7
マルトース	1.4
D-ガラクトース	1.2
D-グルコース-6-リン酸	1.1
D-フルクトース	0.86
L-アラビノース	0.1>
ラクトース	0.1>
D-ソルビトール	0.1>
グルコン酸	0.1>
スクロース	0.1>
D-マンニトール	0.1>
L-ソルボース	0.1>
D-リボース	0.1>
L-ラムノース	0.1>
D-グルコース-1-リン酸	0.1>
D-ラフィノース	0.1>
エタノール	0.1>
グリセロール	0.1>

【0044】

【表2】

基質	終濃度 (mM)	相対活性 (%)
D-グルコース	550	100
マルトース	550	2.8
D-グルコース	100	100
マルトース	100	0.5

【0045】

7. 分子量およびサブユニット分子量:

補酵素結合型グルコース脱水素酵素を、0.2 M NaClを含む50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、移動相に同緩衝液を使用してTSK gel-3000 SW (直径0.75 cm×長さ60 cm、東ソー社製) にて分析した。分子量マーカー(オリエンタル酵母工業社製)を指標にして、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の分子量は約130 kDaであった。12.5% ポリアクリルアミドゲルを使用しLaemmliらの方法に従い、この発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に掛けた。泳動後にクマシー・ブリリアント・ブルー染色し、移動度を分子量マーカー(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)のそれと比較した結果、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素のサブユニット分子量は約85 kDaであった。

【0046】

8. 阻害剤

前記の活性測定方法-1に、終濃度が1 mMになるように表3の各種添加物をそれぞれ加え、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の活性を測定した。対照区は、表3の添加物を加えない以外は活性測定方法-1に従い行った。測定結果は該対照区の値を基準に相対値として表3に示した。

その結果、表3に示す阻害効果が認められた。

また、前記の活性測定方法-1に、終濃度が5 mM、10 mM、25 mM、50 mMになるようにメタノールに溶解した1,10-フェナントロリンをそれぞれ加え、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の活性を測定した。この時のメタノールはいずれも終濃度10%(v/v)であった。対照区は、活性測定方法-1に、終濃度が10%(v/v)になるようにメタノールを添加して測定を行った。結果を表4に示した。その結果、1,10-フェナントロリンによる阻害効果は、1,10-フェナントロリンが、最終濃度1 mMで62.0%、5 mMで76%、10 mMで85%、25 mMで91%、50 mMで95%と高かった。

該阻害効果は、各添加物により異なり、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素は重金属イオン(Ag⁺、Cu²⁺、Hg²⁺)で強く阻害され、1,10-フェ

ナントロリン、プロフラビン、 Mn^{2+} で60%以上阻害された。

【0047】

【表3】

添加物	阻害効果(%)	添加物	阻害効果(%)
なし	0	キナクリン	5
$NaNO_3$	0	トリトンX-100	5.2
$ZnCl_2$	0	$CoCl_2$	7
$AlCl_3$	0	リンゴ酸	8.1
安息香酸	0	D-酒石酸	8.5
EDTA	0.4	ヨード酸	9.5
$CdCl_2$	0.8	システアミン	9.8
$LiCl$	0.9	2,2'-ビピリジン	10.8
アミノグアニジン硫酸塩	1.1	8-キノリノール	13.9
H_2O_2	1.7	KCN	14.5
N-エチルmaleimide	1.8	$NiCl_2$	15.5
尿素	1.9	$FeCl_3$	25
$NaCl$	2.5	malein酸	26.2
チロシン	2.5	アクリノール	29
$BaCl_2$	2.6	2-ニトロ安息香酸	44.3
$PbCl_2$	2.7	$SnCl_2$	45.5
$MgCl_2$	2.9	アクリフラビン	49
フマル酸	3.4	1,10-フェナントロリン	62
シクロセリン	3.6	プロフラビン	62
D-レベニシラミン	4.3	$MnCl_2$	75.5
meso-酒石酸	5.6	$AgNO_3$	99.4
クエン酸	5.6	$CuCl_2$	100
$CaCl_2$	5.7	$HgCl_2$	100

【0048】

【表4】

1,10-フェナントロリン終濃度 (mM)	阻害効果(%)
0	0
50	95
25	91
10	85
5	76

【0049】

9. 補酵素:

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素溶液にD-グルコースを添加すると385 nmおよび465 nmにあった吸収極大が消失し、補酵素がフラビンアデニンジヌクレオチドであることが明らかになった。

【0050】

実施例4. グルコースの定量

前記の実施例2で精製した寄託菌株97508株由来の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用し、前記の活性測定方法1における333mM D-グルコースを、0.333～33mMの範囲のD-グルコースに代えて使用した場合の吸光度の減少速度を測定した。すなわちD-グルコースの濃度が、0.333mM、0.5mM、1mM、2mM、5mM、6.67mM、10mM、20mM、33mMの各濃度における吸光度変化を測定した。測定結果を図5に示す。

その結果、検量線が作成できた。このことは、補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用してD-グルコースの定量が可能であることを示す。

【0051】

【発明の効果】

本発明によって、マルトースへの作用性が5%以下であり、1,10-フェナントロリンで阻害される、可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の提供が可能となった。さらには工業的生産に適した該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法、その為の生産微生物が提供される。これによって、補酵素結合型グルコース脱水素酵素の産業的用途への応用が可能となり、詳細には、マルトースを成分とする輸液を投与した糖尿病患者の血糖値をも正確に測定可能となった。また、本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用することで、グルコースセンサにおいても微量のグルコースが測定可能で、かつ利用可能となった。また、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した試料中のグルコースの測定方法、消去方法、有機化合物の製造方法などを含む物質生産および分析の用途において使用が可能となり、医薬、臨床分野および食品分野での素材の改質加工に使用可能であるなど、利用価値の高い酵素の提供が可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の至適pHを示す相対活性(%)とpHとの相関を示した図である。

【図2】

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の安定 pH を示す残存活性(%)と pH との相関を示した図である。

【図 3】

本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の至適温度を示す相対活性(%)と温度との相関を示した図である。

【図 4】

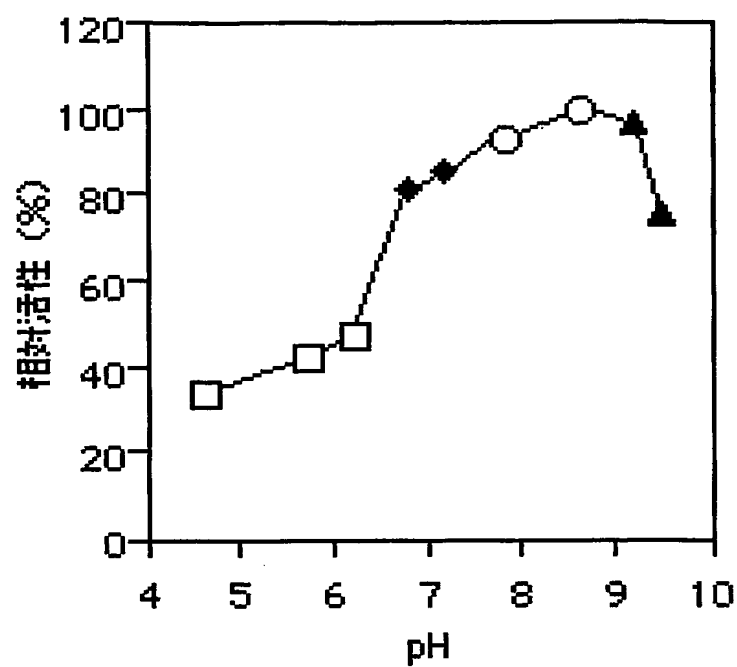
本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の温度安定性を示す残存活性(%)と温度との相関を示した図である。

【図 5】

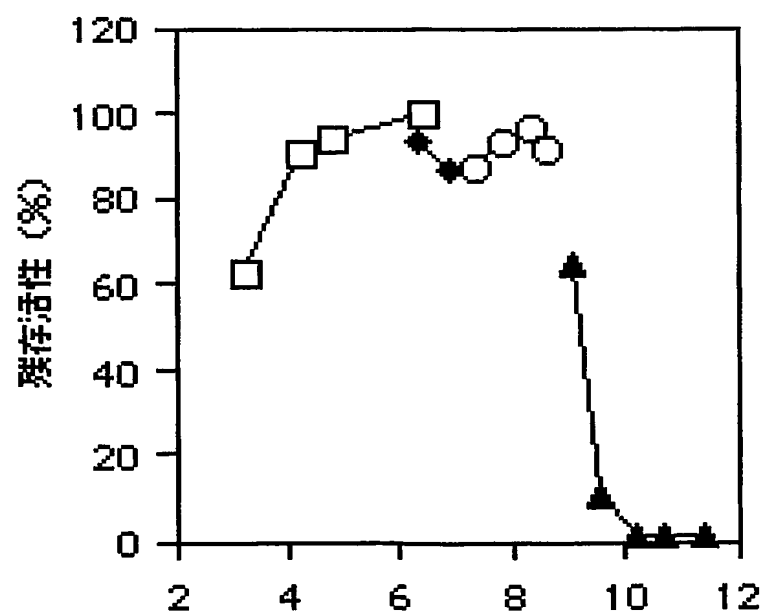
グルコース測定のための検量線を示した図である。

【書類名】 図面

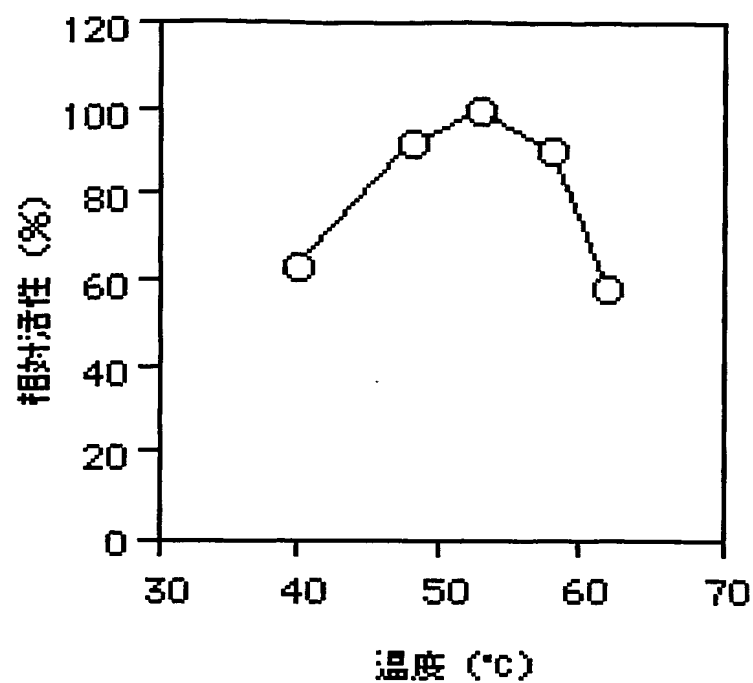
【図1】



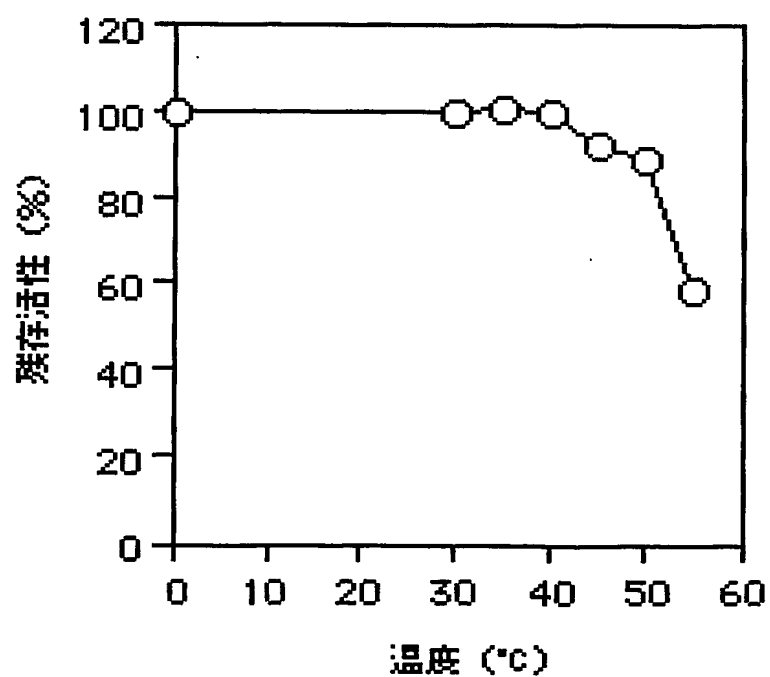
【図2】



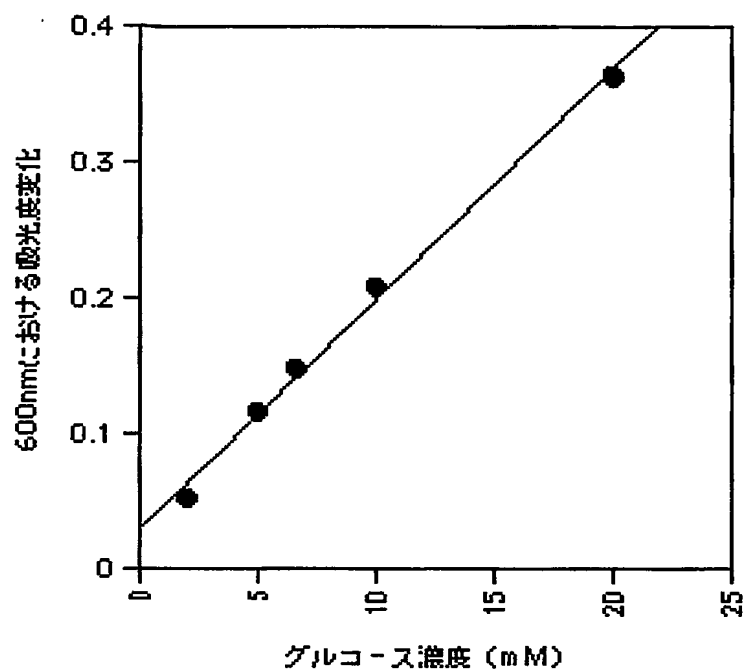
【図3】



【図4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 電子受容体存在下でグルコースを酸化する反応を触媒し、マルトースへの作用性が5%以下と低く、1,10-フェナントロリンで阻害される微生物由来の可溶性の補酵素結合型グルコース脱水素酵素を提供する。さらに、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素の製造方法および該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した測定方法ならびに測定試薬を提供する。

【効果】 本発明の補酵素結合型グルコース脱水素酵素の産業的用途への応用が可能となり、該補酵素結合型グルコース脱水素酵素を使用した試料中のグルコースの測定方法、消去方法、有機化合物の製造方法などを含む物質生産および分析の用途において使用が可能となる。また、血糖値を正確に測定可能なグルコースセンサを提供可能となった。よって、医薬、臨床分野および食品分野での素材の改質加工に使用可能であるなど、利用価値の高い酵素の提供が可能となった。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 7 3 2 9 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 2 1 0 0 6 7]

1. 変更年月日

1 9 9 4 年 3 月 2 8 日

[変更理由]

住所変更

住 所

広島県福山市箕沖町 9 5 番地 7

氏 名

池田食研株式会社